

Synthese und Struktur-Aktivitätsuntersuchungen von Indirubin-Derivaten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen
Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation (D 386)

vorgelegt von
Diplom Lebensmittelchemiker
Stephan Mühlbeyer

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 2007

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17.12.2007

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ing. Stefan Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Marko

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2001 und April 2005 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und wohlwollende Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Frau Prof. Dr. Doris Marko danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. Ing. Stefan Ernst möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CAK	CDK aktivierende Kinase
cdc	engl. <i>cell division cycle</i> : Zellteilungszyklus
cdc2	Enzym 2 des Zellteilungszyklus (<i>cell division cycle 2</i> , identisch mit CDK1)
CDK	engl. <i>cyclin-dependent kinase</i> : cyclin-abhängige Kinase
CKI	engl. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> : Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
CML	Chronisch myeloische Leukämie
d	Dublett
dd	Doppeldublett
d.h.	das heißt
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	(Hexadeutero-)Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dt	Doppeltriplett
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether-)N,N,N',N',-tetraessigsäure
FKS	fötales Kälberserum
h	Stunden

i.A.	im Allgemeinen
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50 %-ige Wirkung im Vergleich einer unbehandelten Kontrolle bewirkt
k.H.	keine Hemmung
LXFL	humaner Tumorxenograft: großzelliges Lungenkarzinom
M	mol pro Liter
MCF-7	Zelllinie aus dem pleuralen Erguss einer Patientin mit metastasierendem Mamakarzinom
min	Minuten
MOPS	4-Morpholino-propansulfonsäure
μM	10 ⁻⁶ mol pro Liter
n.b.	nicht bestimmt
PBS	phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Kinase
PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Kinase
R _f	engl. <i>ratio of fronts</i> , in der Dünnschichtchromatographie: Quotient aus der Entfernung (Start – Substanzfleck (Mitte) und der Entfernung (Start – Lösungsmittelfront)
RSA	Röntgenstrukturanalyse
s	Singulett
SRB	Sulforhodamin B
t	Triplett
TCA	Trichloressigsäure
TMG	Tetramethylguanidin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolett

Aminosäuren und ihre Symbole

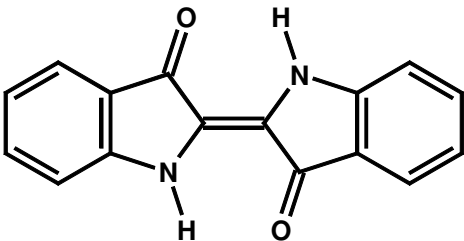
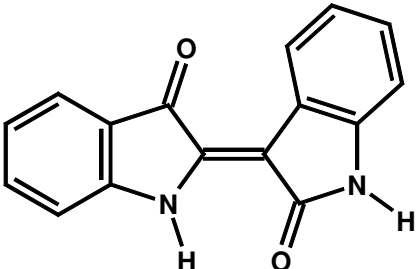
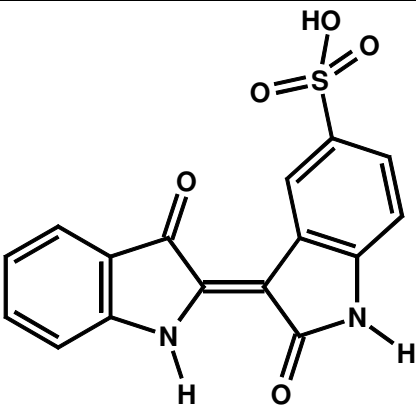
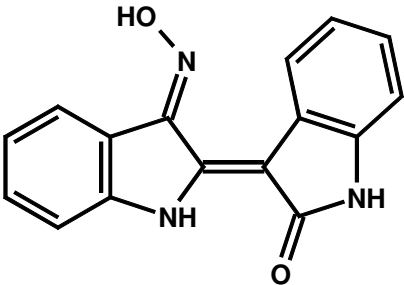
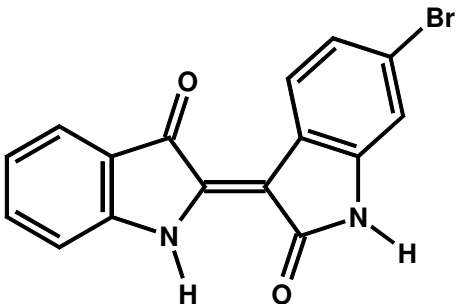
A, Ala, Alanin	I, Ile Isoleucin	R, Arg Arginin
C, Cys Cystein	K, Lys Lysin	S, Ser Serin
D, Asp Asparaginsäure	L, Leu Leucin	T, Thr Threonin
E, Glu Glutaminsäure	M, Met Methionin	V, Val Valin
F, Phe Phenylalanin	N, Asn Asparagin	W, Trp Tryptophan
G, Gly Glycin	P, Pro Prolin	Y, Tyr Tyrosin
H, His Histidin	Q, Gln Glutamin	

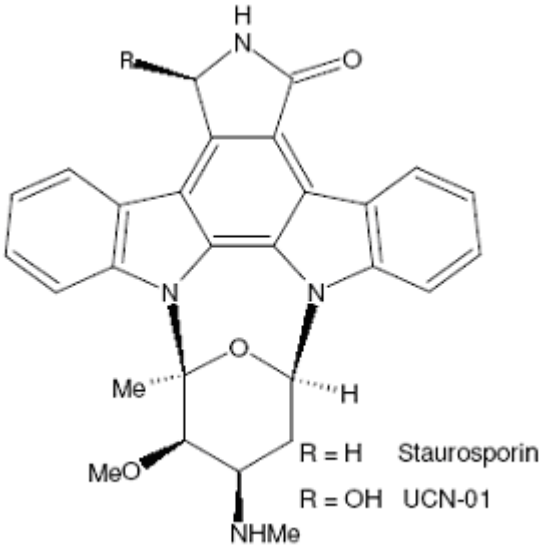
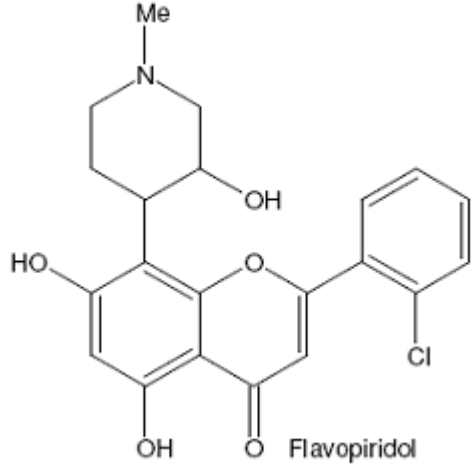
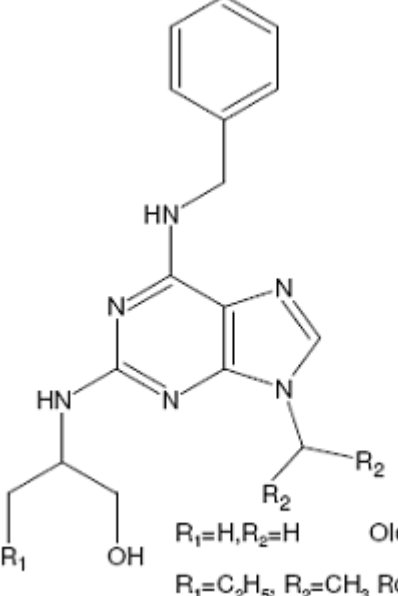
Inhaltsverzeichnis

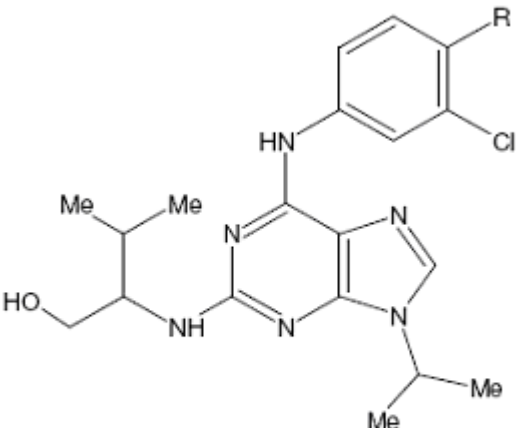
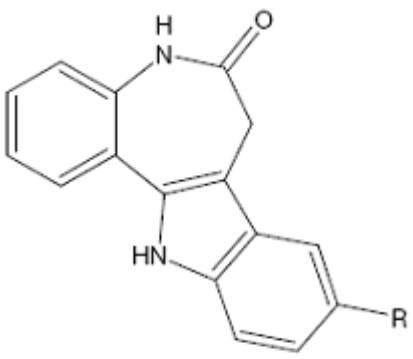
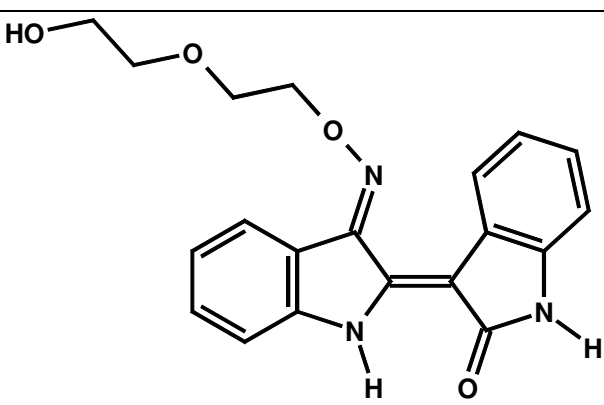
Tabellarischer Überblick über die wichtigsten in dieser Arbeit erwähnten Verbindungen	1
1. Einleitung	14
2. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Indirubin-Derivaten	16
3. Weitere niedermolekulare CDK-Inhibitoren	18
4. Ausgewählte Targets von Indirubin-Derivaten	20
4.1. CDK	20
4.1.1. Regulation der CDK-Aktivität	22
4.2. GSK-3 β	23
4.2.1. Regulation der GSK-3 β - Aktivität	25
4.2.2. Der PI3-Kinase-Weg	25
4.2.3. Der Wnt-Signal-Weg	26
4.3. STAT-Inhibition	29
4.4. Inhibition von VEGF-Rezeptor Tyrosinkinasen	32
5. Kristallstrukturen	34
5.1. CDK2	34
5.2. GSK-3 β	37
5.3. Intermolekulare Wasserstoffbrücken	40
6. Problemstellung	41
7. Ergebnisse und Diskussion	45
7.1. Grundlegende Syntheseverfahren	45
7.1.1. Kondensation von Isatin und Indoxylacetat	45
7.1.2. Synthese von Indirubin-3'-oxim	45
7.1.3. Synthese von Indirubin-3'-oximether – Derivaten	46
7.2. Ergebnisse der Synthesen	47
7.2.1. Synthese der Indirubin-sulfonsäure-Derivate	47
7.2.2. Synthese der 3'-Hydroxyimino-5-sulfonamid-Derivate	48
7.2.3. Synthese der Indirubin-3'-oximether-Derivate	49
7.2.4. Synthese der Indirubin-Derivate mit einer Acetamid-Gruppe in Position 3' ..	50
7.2.5. Synthese der 5-(Amino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether-Derivate	51
7.2.5.1. Synthese des 2-Bromethyl- <i>tetra-O-acetyl</i> - β -D-glucopyranosids	52
7.2.5.2. Verknüpfung des 2-Bromethyl- <i>tetra-o-acetyl</i> - β -D-glucopyranosids mit Indirubin-3'-oxim-Derivaten	53
7.2.6. Synthese des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids (E807)	53
7.2.7. Synthese von 5-Carboxy-indirubin (E810)	57
7.2.8. Diskussion ausgewählter NMR-Spektren	58
7.2.8.1. Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether (E803)	59
7.2.8.2. Indirubin-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether (E804)	61
7.2.8.3. 3'-[(2-Hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino-] indirubin (E805)	63
7.2.8.4. 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyl-oxyethyl)-oximether (E811)	65
7.2.8.5. Isatin-5 -(<i>tetra-O-acetyl</i> -)- β -D glucopyranosid (E807)	67
7.3. Ergebnisse der biochemischen Analytik	70
7.3.1. CDK2/CyclinE – Assay	70
7.3.2. GSK-3 β -Assay	72
7.4. Wasserlöslichkeit	73
7.5. Cytotoxizitäts-Test (SRB-Test)	75
8. Zusammenfassung	77

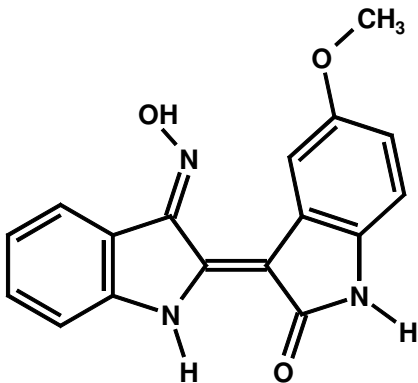
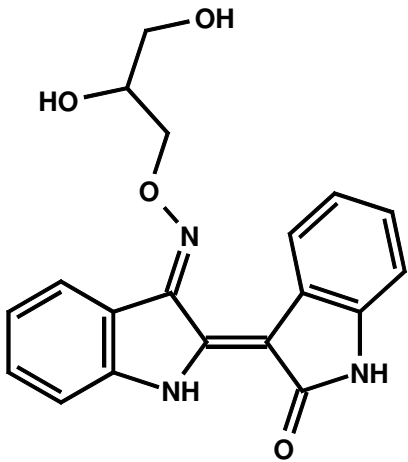
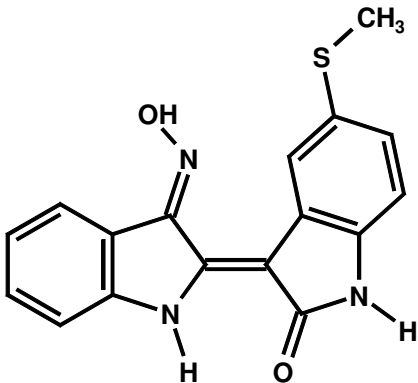
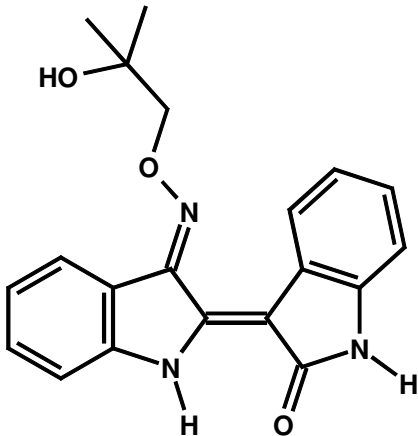
9.	Experimenteller Teil.....	79
9.1.	Geräte und Materialien.....	79
9.1.1.	Chemikalien/Geräte/Materialien für die Synthese	79
9.2.	Synthesevorschriften und analytische Daten.....	80
9.2.1.	Synthese der Indirubin-5-sulfonamid- Derivate.....	80
9.2.1.1.	Synthese von Natrium-indirubin-5-sulfonat.....	80
9.2.1.2.	Synthese von Indirubin-5-sulfonsäurechlorid	81
9.2.1.3.	Synthese von 5-(Piperidin-1-sulfonyl-)indirubin	81
9.2.1.4.	Synthese von 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl-)indirubin	82
9.2.2.	Synthese der Indirubin-3'-oxim – Derivate.....	84
9.2.2.1.	Synthese von Indirubin-3'-oxim	84
9.2.2.2.	Synthese von 3'-Hydroxyimino-5-(piperidin-1-sulfonyl-) indirubin.....	84
9.2.2.3.	Synthese von 3'-Hydroxyimino-5-(pyrrolidin-1-sulfonyl-) indirubin	86
9.2.3.	Synthese der Indirubin-3'-hydroxyalkyl-oximether.....	87
9.2.3.1.	Synthese von Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl-)oximether	87
9.2.3.2.	Synthese von Indirubin-3'-(2,3-dihydroxypropyl)oximether	88
9.2.4.	Synthese der Indirubin-3'-(essigsäureamid)oximether	90
9.2.4.1.	Synthese von Chloracet-ethanolamid.....	90
9.2.4.2.	Synthese von Chloracet-dietahnlamid.....	91
9.2.4.3.	Synthese von 3'-[(2-Hydroxyethyl-)aminocarbonylmethyl-oxyimino-] indirubin	92
9.2.4.4.	Synthese von 3'-[Bis-(2-hydroxyethyl-)aminocarbonylmethyl-oxyimino-] indirubin	93
9.2.5.	Synthese der Derivate der Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl- oximether	95
9.2.5.1.	Synthese von 2-Bromethyl- <i>tetra-O-acetyl</i> -β-D-glucopyranosid	95
9.2.5.2.	Synthese von 5-(Piperidino-sulfonyl-)indirubin-3'-(2-β-D- glucopyranosyloxyethyl-) oximether	96
9.2.5.3.	Synthese von 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin-3'-(2-β-D- glucopyranosylethyl-)oximether	98
9.2.6.	Synthese des Indirubin-5-glucopyranosid	100
9.2.6.1.	Synthese von 5-Hydroxy-isatin.....	100
9.2.6.2.	Synthese des Isatinyl-5-β-D-glucopyranosids.....	102
9.2.6.3.	Synthese des Indirubin-5-β-D-glucopyranosids.....	103
9.2.7.	Synthese von 5-Carboxyindirubin.....	105
9.3.	Biochemische Analytik	106
9.3.1.	CDK2/CycE - Assay	106
9.3.2.	GSK3-β Assay.....	110
9.3.3.	Zellkultur und Cytotoxizitätstest.....	110
9.3.3.1.	Geräte	110
9.3.3.2.	Reagenzien	111
9.3.3.3.	MCF-7 Zelllinie.....	111
9.3.3.4.	Zellkultivierung	111
9.3.3.5.	Mediumwechsel	111
9.3.3.6.	Abtrypsinieren und Zellzahlbestimmung	112
9.3.3.7.	Lagerung der Zellen	113
9.3.3.8.	Auftauen der Zellen.....	113
9.3.3.9.	Mykoplasmen-Test.....	113
9.3.3.10.	SRB-Test	114
9.3.4.	Bestimmung der Wasserlöslichkeit.....	115
10.	Literaturverzeichnis.....	116

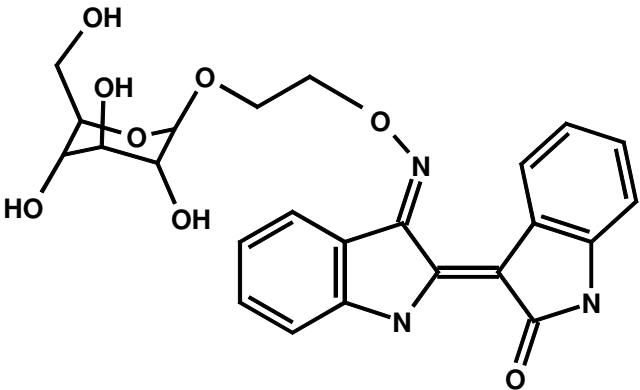
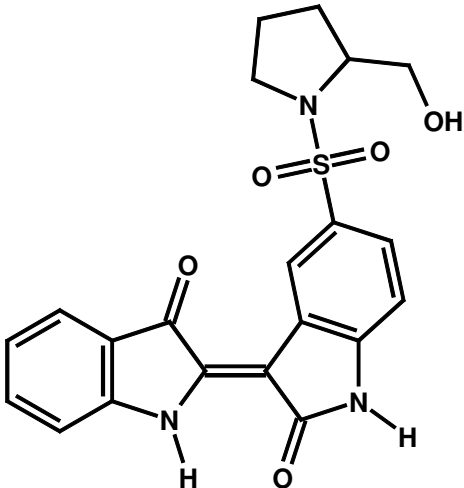
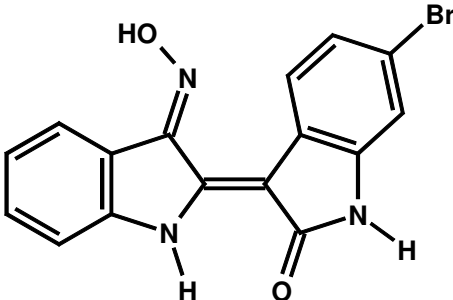
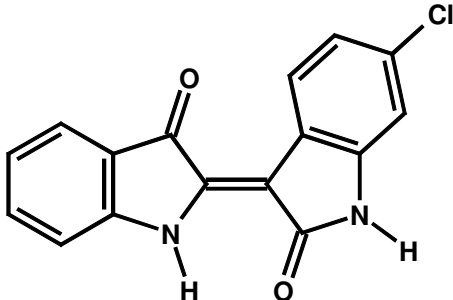
Tabellarischer Überblick über die wichtigsten in dieser Arbeit erwähnten Verbindungen

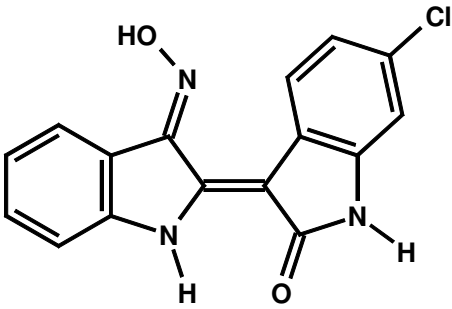
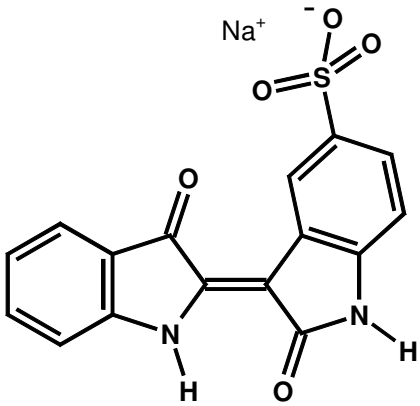
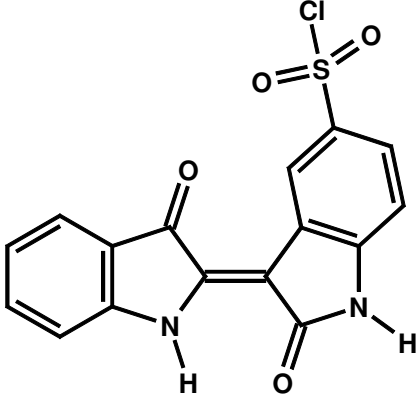
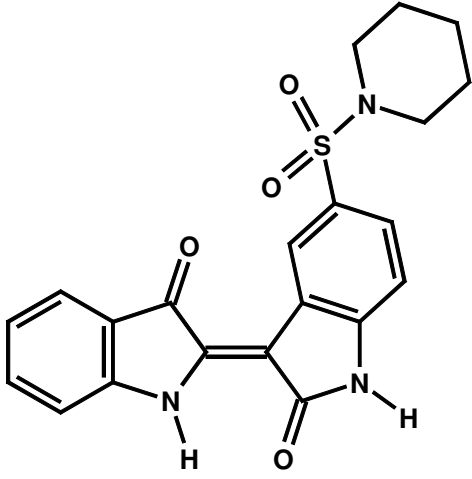
Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>1</u>		Indigo	E220
<u>2</u>		Indirubin	E211
<u>3</u>		Indirubin-5-sulfonsäure	E226
<u>4</u>		Indirubin-3'-oxim	E231
<u>5</u>		6-Bromindirubin	E838

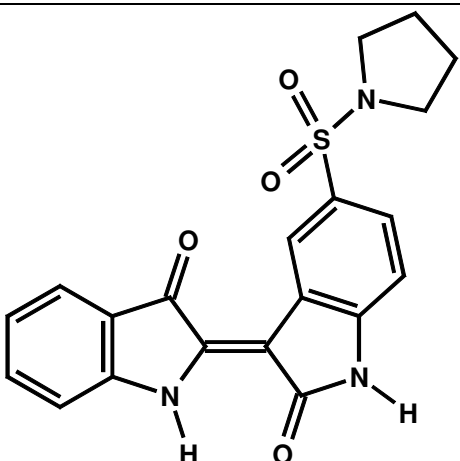
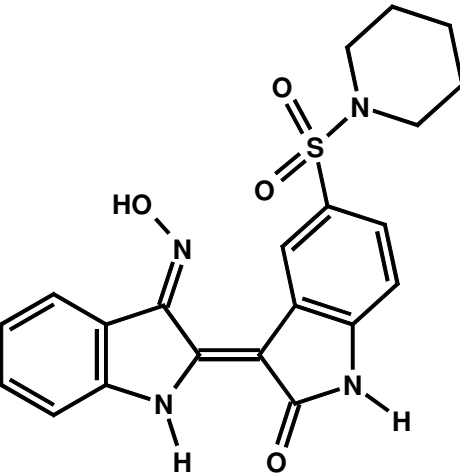
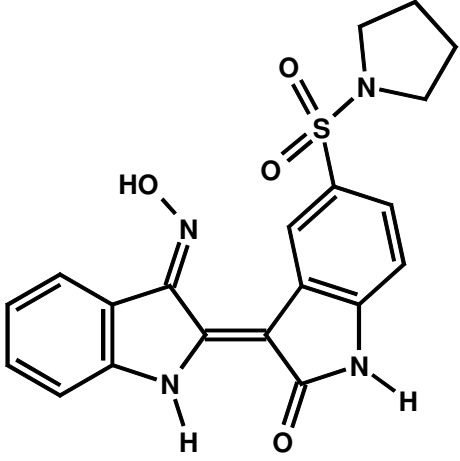
Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
$\frac{6}{+7}$	 <p> $R = H$ Staurosporin $R = OH$ UCN-01 </p>	siehe Bild	-
$\frac{8}{+10}$	 <p>Flavopiridol</p>	siehe Bild	-
$\frac{9}{+10}$	 <p> $R_1 = H, R_2 = H$ Olomoucine $R_1 = C_2H_5, R_2 = CH_3$ Roscovitine </p>	siehe Bild	-

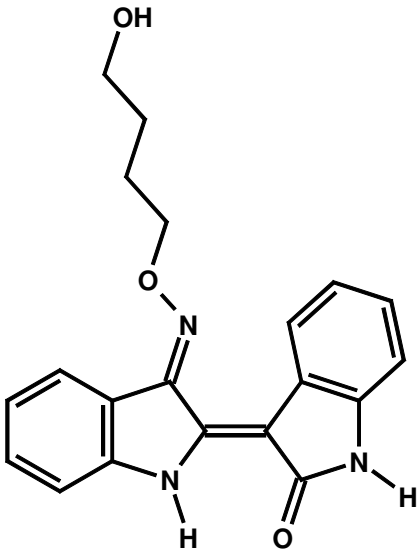
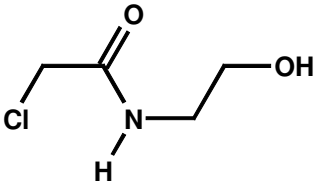
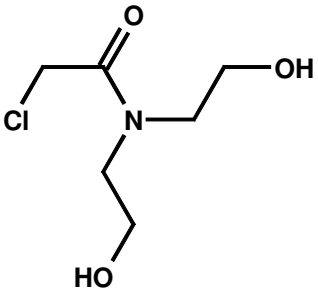
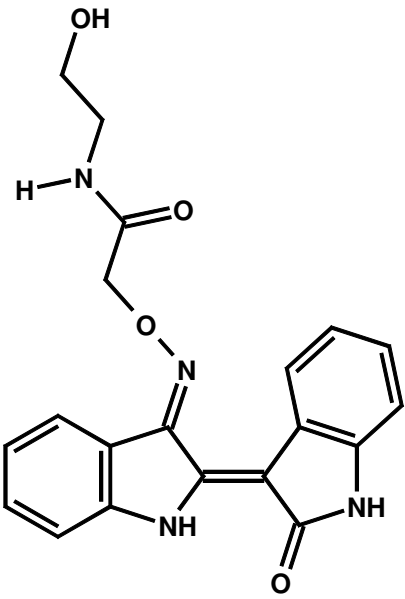
Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>11</u> <u>+ 12</u>	 <p>R = H Purvalanol A R = COOH Purvalanol B</p>	siehe Bild	-
<u>13</u> <u>+ 14</u>	 <p>R = Br Kenpaulon R = NO₂ Alsterpaulon</p>	siehe Bild	-
<u>15</u>		Indirubin-3'-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethyl]-oximether	E564

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>16</u>		5-Methoxy-indirubin-3'-oxim	E728
<u>17</u>		Indirubin-3'-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether	E804
<u>18</u>		5-Mercapto-methyl-indirubin-3'-oxim	-
<u>19</u>		Indirubin-3'-[2-hydroxy-2-methylpropyl]-oximether	E565

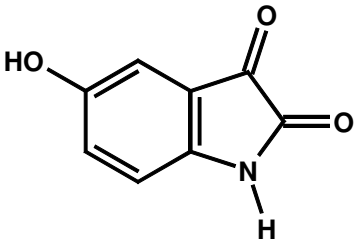
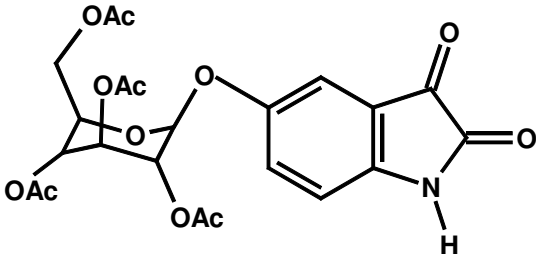
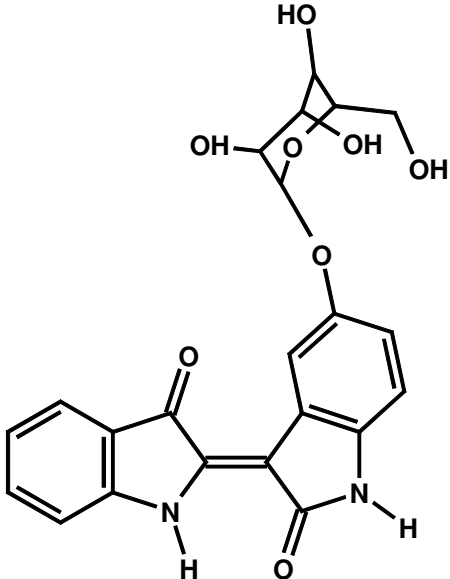
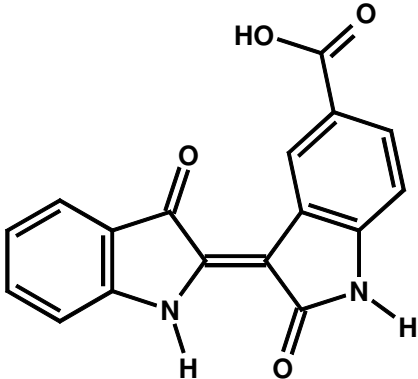
Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>20</u>		Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether	E671
<u>21</u>		5-[(2-Hydroxymethyl)-pyrrolidin-1-sulfonyl]-indirubin	-
<u>22</u>		6-Bromindirubin-3'-oxim (BIO)	E839
<u>23</u>		6-Chlorindirubin	-

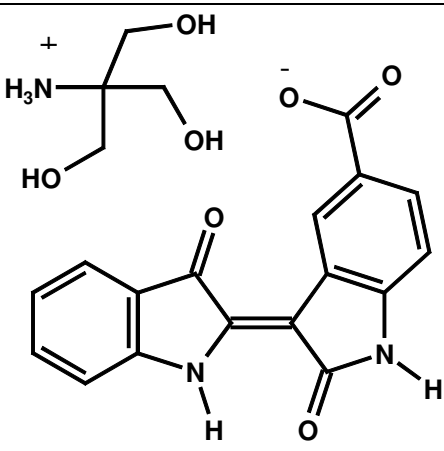
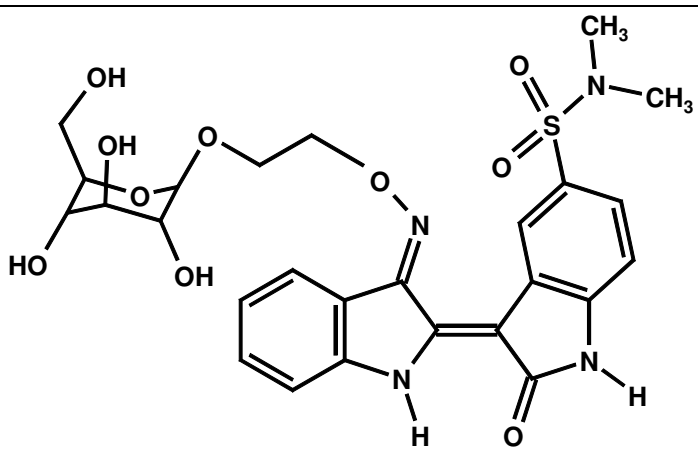
Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>24</u>		6-Chlorindirubin-3'-oxim	-
<u>25</u>		Indirubin-5-sulfonat, Natriumsalz	-
<u>26</u>		Indirubin-5-sulfonsäurechlorid	-
<u>27</u>		5-(Piperidino-sulfonyl-)indirubin	E800

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>28</u>		5-(Pyrrolidino-sulfonyl-)indirubin	E801
<u>29</u>		5-(Piperidino-sulfonyl-)indirubin-3'-oxim	E812
<u>30</u>		5-(Pyrrolidino-sulfonyl-)indirubin-3'-oxim	E802

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>31</u>		Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether	E803
<u>33</u>		Chloracet-ethanolamid	-
<u>34</u>		Chloracet-diethanolamid	-
<u>35</u>		3'-[(2-Hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino-]indirubin	E805

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>36</u>		3'-[Bis-(2-hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino-] indirubin	E806
<u>37</u>		2-Bromoethyl- <i>tetra-O-acetyl</i> - β - D-glucopyranosid	-
<u>38</u>		5-(Piperidino- sulfonyl)- indirubin-3'- (2- β -D- glucopyranosyl oxyethyl)- oximether	E808
<u>39</u>		5-(Pyrrolidino- sulfonyl)- indirubin-3'- (2- β -D- glucopyranosyl oxyethyl)- oximether	E811

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>40</u>		5-Hydroxy-isatin	E733
<u>41</u>		Isatin-5- <i>tetra-O-acetyl</i> - β -D-glucosid	-
<u>42</u>		Indirubin-5- β -D-glucopyranosid	E807
<u>43</u>		5-Carboxyindirubin	E810

Nr.	Struktur	Name	*E-Nummer
<u>44</u>		Tris-Salz des 5-Carboxyindirubins	E813
<u>45</u>		5-(Dimethylamino sulfonyl)-indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyl ethyl)-oximether	E690

* Die E-Nummer ist eine Arbeitsgruppeninterne Nummerierung für in der Arbeitsgruppe synthetisierte Verbindungen

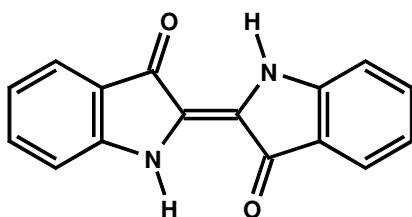
1. Einleitung

Seit dem Altertum bedient sich die Menschheit verschiedener Pflanzen und Kräuter zur Behandlung von Krankheiten. Noch heute werden zahlreiche neue pharmakologisch aktive Stoffe bzw. deren Leitstrukturen aus Pflanzen gewonnen.

Auch in der traditionellen chinesischen Medizin spielen Heilkräuter eine große Rolle, wobei man hier auf einen mittlerweile über 2000 Jahre alten Erfahrungsschatz zurückgreifen kann. Bekannt sind über 100.000 Rezepturen zur Behandlung der unterschiedlichsten Krankheiten, wie z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, nervöse Leiden, sowie Leiden des Atmungs- oder Verdauungsapparates. [Zhang, 2002].

Zur Behandlung vieler chronischer Krankheiten wird z.B. auf ein Rezept namens Danggui Longhui Wan zurückgegriffen, eine Wirkstoffmischung aus 11 Kräutern. Diese Zubereitung erwies sich auch als ein wirksames Mittel gegen chronisch myeloische Leukämie (CML). Genauere Untersuchungen ergaben, dass die antileukämische Wirkung auf eine bestimmte Komponente der Zubereitung zurückzuführen ist, dem Qing Dai (Indigo naturalis). Dabei handelt es sich um ein blau-schwarzes Pulver, dessen Hauptkomponente der blaue Farbstoff Indigo bildet. Die eigentliche antileukämische Wirkung ist allerdings einem Nebenbestandteil zuzuschreiben, dem Indirubin, einem rotfarbenem Isomer des Indigo [Hoessel et al. 1999].

Indigo



Indirubin

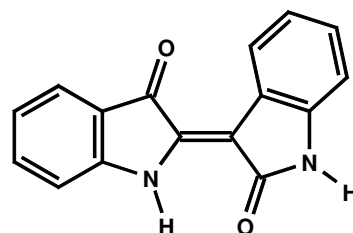


Abbildung 1-1 Indigo und Indirubin, Bestandteile des Qing Dai (Indigo naturalis)

In klinischen Tests an 314 CML-Patienten führte eine Therapie mit Indirubin in 26% der Fälle zu einer kompletten Remission, während bei 36% eine partielle Remission zu beobachten war [Cooperative group of clinical therapy of indirubin, 1980]. Dabei zeigten sich lediglich leichte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Durchfall, Erbrechen, und leichte Bauchschmerzen. Damit

erwies sich Indirubin als ähnlich effektiv wie Busulfan, dessen Prozentsatz an kompletter Remission in einer Vergleichsstudie nur geringfügig höher lag, dessen häufigste Nebenwirkung, die Knochenmarktoxizität, im Vergleich zum Indirubin jedoch einen Nachteil darstellt.

Dieses vielversprechende Ergebnis weckte ein gesteigertes Interesse an einem eventuellen Einsatz des Indirubins und dessen Derivaten als Krebs-Therapeutikum.

2. Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Indirubin-Derivaten

Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus von Indirubin-Derivaten wurden in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe Eisenbrand mit L. Meijer und J. Endicott gefunden.

An einem Panel von 25 Kinasen wurde die inhibitorische Aktivität* von Indigo, Indirubin und verschiedenen Derivaten des Indirubins untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Indirubin und dessen Derivate potente Inhibitoren cyclin-abhängiger Kinasen (CDK, cyclin dependent kinase) sind. So liegt der IC_{50} Wert von Indirubin für die CDK1, CDK2, CDK4 und CDK5 zwischen 2,2 μ M und 12 μ M, während für die restlichen Kinasen meist Werte von $>100 \mu$ M gemessen wurden. Indirubin-5-sulfonsäure hat eine noch stärkere inhibitorische Wirkung auf die CDKs mit IC_{50} Werten zwischen 0,035 μ M und 0,3 μ M [Hössel et al., 1999].

Da CDKs in hohem Maße an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, sollte deren Inhibition zur Deregulation desselbigen führen. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mehrerer Zelllinien, unter anderem Jurkat- und MCF-7 Zellen, mit Indirubin-3'-oxim zu einem Zellzyklus-Arrest führt. In Abhängigkeit der Wirkstoff-Konzentration wurde dabei ein Arrest bei G1/S oder ein Arrest bei G2/M beobachtet [Hössel et al., 1999; Marko et al., 2001]. Für die Substanz E671, dem Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether, konnte weiterhin eine Hemmung der pRb-Phosphorylierung nachgewiesen werden, ein Prozeß, der CDK4- und CDK2-abhängig ist [Jacobs, 2002].

Im Laufe der Zeit hat sich herausgestellt, dass Indirubin-Derivate auch die Aktivität weiterer Proteine beeinflussen. So haben sich einige Derivate (z.B. 6-Bromindirubin) auch als potente Inhibitoren der Glykogensynthase-kinase-3 (GSK-3) erwiesen [Meijer et al., 2003]. Dieses Enzym ist an zahlreichen biochemischen Signalwegen beteiligt, welche in verschiedenen Tumorzellen dereguliert sind.

Sowohl die CDKs als auch die GSK3 werden durch Indirubin-Derivate in einer ATP-kompetitiven Weise gehemmt, wobei sich der Inhibitor in die ATP-Bindungstasche des Enzyms einlagert. Dadurch ist die Tasche besetzt, und der eigentliche Phosphat-Donor ATP kann nicht mehr gebunden werden.

* Die inhibitorische Aktivität wird dabei in Form des IC_{50} - Wertes ausgedrückt, welcher die Konzentration eines Stoffes bezeichnet, bei der die Enzymaktivität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe um die Hälfte verringert wird.

Auch die Aktivität der STAT-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription) und des VEGF-Rezeptors (Epidermal Growth Factor) wird durch einige Indirubin-Derivate gehemmt [Nam et al., 2005; Jautelat et al., 2002].

3. Weitere niedermolekulare CDK-Inhibitoren

Neben Indirubin-Derivaten sind eine Reihe weiterer CDK-Inhibitoren bekannt, von denen sich einige in der klinischen Testung für den Einsatz als Antitumorwirkstoff befinden.

Abbildung 3-1 zeigt eine Auswahl bekannter Verbindungen, wobei es sich teilweise um wenig spezifische Kinase-Inhibitoren handelt. Als Beispiel sei Staurosporin genannt, das mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich an der MAPK, der PKA und PKG eine ähnliche inhibitorische Wirkung zeigt wie an einigen CDKs. Für einen Einsatz als Antitumor-Wirkstoff ist Staurosporin nicht geeignet, da sich *in vivo* bereits bei therapeutisch nicht wirksamen Dosen unerwünschte toxische Effekte zeigen [Sausville et al., 2000]. Eine Substitution des Wasserstoffs an Position 7 durch eine OH-Gruppe führt mit den Derivaten UCN-01 und UCN-02, zwei C^7 -Diastereomere des Staurosporins, zu wirksameren und für therapeutische Zwecke besser geeigneten Verbindungen. UCN-01, das wirksamere der beiden Derivate, befindet sich in den USA zurzeit in Phase II der klinischen Testung [Senderowicz, 2002; Kortmansky et al., 2005].

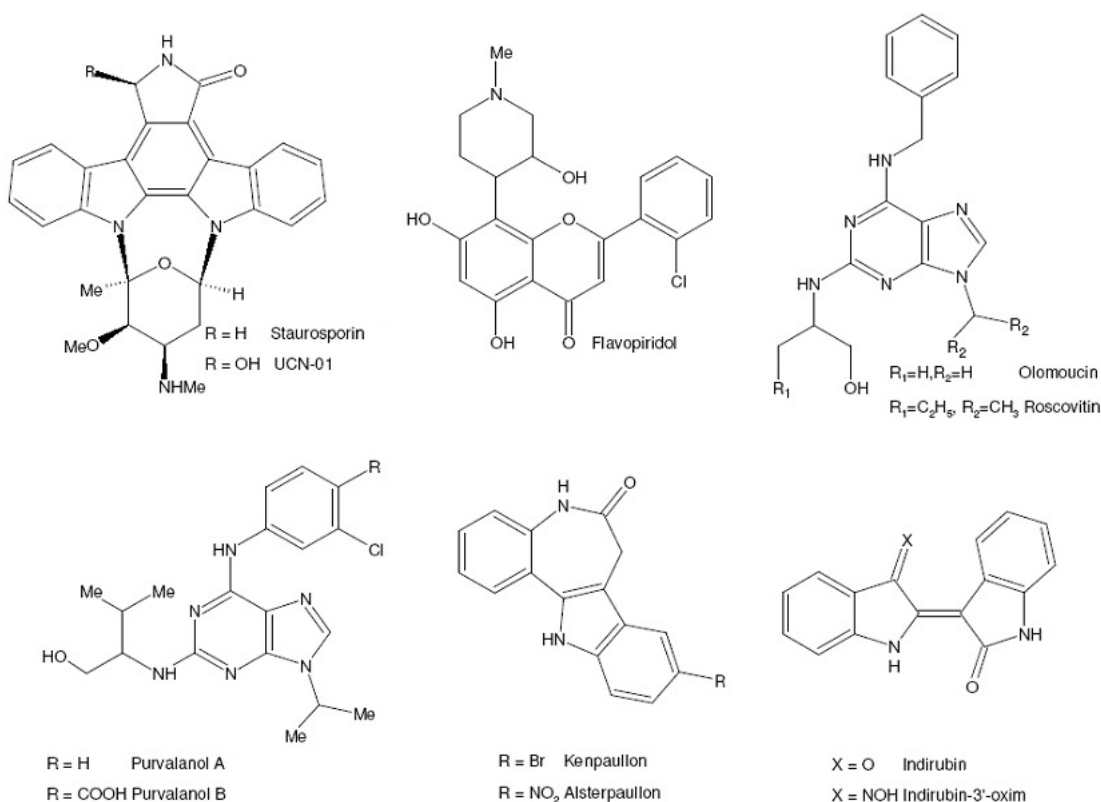


Abbildung 3-1 Einige bekannte Inhibitoren Cyclin abhängiger Kinasen

Das Flavonderivat Flavopiridol zeigt neben einer CDK2- und CDK4-hemmenden Wirkung auch eine signifikante *in vivo* - Antitumorwirkung an Xenograft-Lungen, -Kolon- und Brustkrebs-Tumoren [Fischer und Lane, 2000]. Außerdem erwies es sich als ein potenter Wirkstoff gegen Prostata-Tumoren [Sedlacek et al. (1996), Drees et al. (1997)] und befindet sich ebenso wie UCN-01 in der klinischen Testung (Phase I und II).

Olomoucine gilt als einer der ersten auf einem Purin-Grundgerüst basierenden selektiven CDK-Inhibitoren. Weitere Modifikation in der Struktur der Seitenketten führten dann zu Roscovitin, das eine 10-fach höhere CDK-Inhibition bei ähnlicher Selektivität aufweist. Die bis dato höchste CDK-hemmende Wirksamkeit in der Reihe der Purin-Analoga zeigen Purvalanol A und B. Sie verfügen mit IC_{50} -Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich über eine bis zu 1000-fach stärkere Wirksamkeit als Olomoucine.

Auch die zur Gruppe der Benzazepine gehörenden Paullone, die als Inhibitoren der CDK1, 2 und 5 identifiziert wurden, weisen mit Kenpaullon und Alsterpaullon IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich auf.

Von den hier aufgeführten Verbindungen haben sich Staurosporin, Flavopiridol, Kenpaullon und Alsterpaullon auch als potente Inhibitoren der GSK-3 β erwiesen [Meijer et al., 2004]. Für Purvalanol und Roscovitin stellt die GSK-3 β allerdings kein Target dar.

4. Ausgewählte Targets von Indirubin-Derivaten

4.1. CDK

Die Zelle durchläuft während ihres Lebens einen sogenannten Zellzyklus, welcher in mehrere Phasen (G_1 -Phase, S-Phase, G_2 -Phase und Mitose) unterteilt ist. Diese sind wiederum durch verschiedene Kontrollpunkte (Checkpoints) voneinander getrennt, an denen geprüft wird, ob alle notwendigen Voraussetzungen für den Eintritt in die jeweils nächste Phase erfüllt sind. Ist dies nicht der Fall, so wird der Übergang in die nächste Phase so lange verzögert, bis die Fehler behoben sind, oder –bei irreparablen Fehlern- Apoptose eingeleitet.

In der G_1 -Phase synthetisiert die Zelle zahlreiche Bausteine (Proteine), die für den Eintritt in die nächste Phase benötigt werden. Mit dem Eintritt in die S-Phase wird dann die DNA-Synthese eingeleitet, so dass der für eine spätere Zellteilung benötigte tetraploide Chromosomensatz vorhanden ist. In der sich anschließenden G_2 -Phase wird das vorhandene Material auf Vollständigkeit geprüft, bevor in der Mitose die endgültige Zellteilung durchgeführt wird (siehe Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Die Phasen des Zellzyklus.

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen Cyclin abhängige Kinasen (CDKs, cyclin dependent kinases). Dabei handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, von denen bisher zehn verschiedene (CDK1-10) bekannt sind [Giannis et al., 2003].

Kinasen sind Enzyme, die Phosphat-Reste auf spezifische Substrate übertragen. Bei den übertragenen Phosphat-Resten handelt es sich meistens um die γ -Phosphat-Gruppe des ATP, das zusammen mit dem Substrat in der Bindungstasche der Kinase gebunden wird. Durch

Phosphorylierung ihrer Substrate regulieren die Kinasen deren Aktivität, wobei sowohl eine Aktivierung als auch eine Deaktivierung möglich ist.

Cyclin-abhängige Kinasen können ihre volle Aktivität erst erlangen, nachdem sie mit einem weiteren Protein, dem Cyclin, assoziiert sind. In diesem binären Enzymkomplex fungiert die CDK als katalytische und das Cyclin als regulatorische Untereinheit. Für Säugerzellen wurden bisher mindestens 16 verschiedene Cyclin-Familien beschrieben [Fischer und Lane, 2000], wobei die Komplexbildung nur zwischen bestimmten CDK/Cyclin-Kombinationen beobachtet wird, z.B. CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D und CDK1/Cyclin B. In jeder Phase des Zellzyklus sind unterschiedliche CDK/Cyclin-Komplexe aktiv (siehe Abbildung 4-2).

Unter dem Einfluss mitogener Stimuli werden während der frühen G₁-Phase D-Cycline synthetisiert, welche dann mit CDK4 und CDK6 assoziieren. Der entstandene Proteinkomplex phosphoryliert daraufhin das Retinoblastom-Protein pRb, welches im hypophosphorylierten Zustand Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie bindet, und diese dadurch inaktiviert. Wird pRb phosphoryliert, so werden die gebundenen Transkriptionsfaktoren freigesetzt und führen zur Expression entsprechender Gene, z.B. für die Dihydrofolatreduktase, die Thymidinkinase und die DNA-Polymerase- α [Johnson und Walker, 1999]. Auch die Expression der Cycline A und E wird durch die E2F Transkriptionsfaktoren stimuliert. Dadurch entsteht im weiteren Verlauf der G₁-Phase unter anderem der CDK2/Cyclin E-Komplex, welcher wiederum pRb phosphoryliert und so zu einem positiven Feedback führt. Der CDK2/Cyclin E-Komplex ist essentiell für den Übergang aus der G₁-Phase in die S-Phase [Fischer, P.M., 2000], wobei Cyclin E in zahlreichen Tumorzellen stark überexprimiert ist. So wurde in einigen Brustkrebs-Zelllinien sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene eine bis zu 64-fache Überexpression nachgewiesen [Wingate et al., 2005].

Während der S-Phase spielt dann der CDK2/Cyclin A-Komplex eine zunehmend wichtigere Rolle, da dieser die freien E2F-Transkriptionsfaktoren bindet, phosphoryliert, und somit wieder inaktiviert [Morgan, 1997]. Die Mitose wird von den Komplexen CDK1/Cyclin B1, B2 und B3 reguliert. Diese sorgen z.B. für die Phosphorylierung von Laminen, Histon H1 und verschiedenen Komponenten des Spindelapparates. Um die Mitose zu verlassen, müssen die Cycline A und B zuerst abgebaut werden; ein Prozess, dessen Regulation selbst von der CDK1/Cyclin B Aktivität abhängt [Fischer und Lane, (2000)].

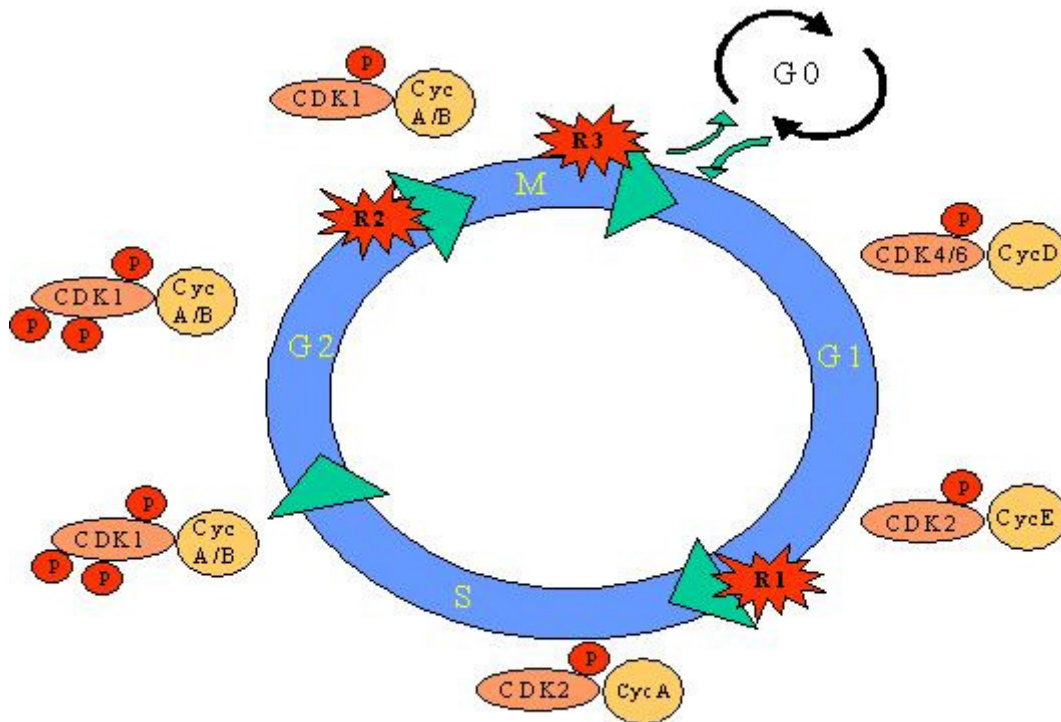


Abbildung 4-2: In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind unterschiedliche CDK/Cyclin-Komplexe aktiv. R1 bis R3 markieren Kontrollpunkte im Zellzyklus; „P“ steht für eine Phosphatgruppe

4.1.1. Regulation der CDK-Aktivität

Um den korrekten Ablauf des Zellzyklus zu sichern, verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen, mit Hilfe derer die Aktivität der CDKs reguliert wird.

Ein bereits oben erwähnter Regulationsschritt für die CDK-Aktivität ist die Assoziation mit Cyclinen. Dadurch erfahren die CDKs meist strukturelle Veränderungen, durch die z.B. das zu phosphorylierende Substrat einen besseren Zugang zu dem katalytischen Zentrum des Enzymkomplexes erhält. Weiterhin wird in Abhängigkeit der assoziierten Cycline eine veränderte Substratspezifität der CDKs vermutet [Arellano und Moreno, 1997]. Während des Zellzyklus sind die Level der verschiedenen CDKs nahezu konstant, während die Cyclin-Konzentrationen stark oszillieren. Als Beispiel sei hier Cyclin D genannt, dessen Synthese durch mitogene Wachstumsfaktoren stimuliert wird, das aber später wieder durch eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut wird.

Auch über posttranslationale Veränderungen kann die Aktivität der CDKs reguliert werden. So können CDKs durch Phosphorylierung sowohl aktiviert als auch inaktiviert werden,

abhängig von der phosphorylierten Aminosäure. Der CDK7/Cyclin H Komplex, auch CAK (CDK activating kinase) genannt, phosphoryliert z.B. die CDK2 am Aminosäurenrest Thr 160, wodurch diese eine Aktivierung erfährt. Auch der Komplex CDK4/Cyclin D erhält erst durch eine CAK-vermittelte Phosphorylierung seine volle Kinase-Aktivität. Ein Beispiel für eine inaktivierende Modifikation ist die Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 der CDK1 durch wee/myt1 Kinasen. Diese hemmende Phosphorylierung wird erst nach Überschreiten des G2/M – Kontrollpunktes durch die Phosphatase Cdc25 wieder rückgängig gemacht, so dass die CDK1/CycA/B - Komplexe nun schrittweise aktiviert werden, und letztendlich die für die Zellteilung notwendigen Veränderungen im Zytoplasma und im Zellkern herbeiführen. CKIs (cyclin dependent kinase inhibitors) stellen eine dritte Möglichkeit dar, die CDK-Aktivität zu regulieren. Dabei handelt es sich um kleine Proteine, die in zwei Familien unterteilt werden: Die p21 (oder KIP-)Familie (p21, p27, p57) und die p16 (oder INK4-) Familie (p15, p16, p18, p19). Während die CKIs der p21-Familie sowohl mit CDK- als auch Cyclin-Untereinheiten interagieren ist die p16-Familie auf die CDK4/6 beschränkt.

4.2. *GSK-3 β*

Die Glykogen-Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist eine den CDKs phylogenetisch nahe verwandte Kinase. Vor über 20 Jahren entdeckt, war sie lange Zeit lediglich als ein Enzym bekannt, das die Glycogen-Synthase phosphoryliert und dadurch inaktiviert. In den letzten Jahren rückte sie jedoch wieder verstärkt in das Interesse der Wissenschaft; nämlich als ein Enzym, das in zahlreiche biochemische/physiologische Signalketten involviert ist. Bei der GSK-3 handelt es sich um eine Ser/Thr - Kinase mit zwei Isoformen (GSK-3 α und GSK-3 β). Zwischen diesen beiden Isoformen besteht im Bereich der katalytischen Domäne eine 97%ige Sequenz-Homologie, lediglich außerhalb der katalytischen Domäne bestehen signifikante Unterschiede (im Gegensatz zur GSK-3 β hat die GSK-3 α einen Glycin-reichen N-Terminus) [Frame S., Cohen, P., 2001]. Die beiden Isoformen sind bezüglich ihrer Funktionen nicht vollständig redundant. So sterben Mäuse-Embryos mit einem homozygoten Defekt am GSK-3 β Gen nach etwa 16 Tagen durch eine massive TNF α (tumor necrosis factor- α)-induzierte Apoptose der Hepatocyten. Der Grund dafür liegt in der explizit GSK-3 β - abhängigen Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor κ B), welche dem TNF α - induzierten Apoptose-Signal entgegenwirkt [Hoeflich et al., 2000]. Dass die Mehrheit der Studien (sowie auch die vorliegende Arbeit) sich mit der β -Isoform der GSK-3 befassen, liegt unter anderem auch in der Tatsache begründet, dass diese Isoform in einem Experiment mit der Fruchtfliege (*Drosophila*

Melanogaster) alle Funktionen von „Shaggy“, dem Fruchtliegen – Homologen der GSK-3, ersetzen konnte. GSK-3 α war dazu nicht in der Lage [Manoukian und Woodget, 2002]. Andererseits gibt es auch Funktionen, die nach jetzigem Stand der Wissenschaft nur auf die GSK-3 α beschränkt sind. So wird die Produktion der neuronalen A β -Peptide (amyloid β), deren Aggregation zu den sog. „amyloid plaques“ bei der Alzheimer Erkrankung eine Rolle spielt, nur durch die GSK-3 α , nicht aber durch die GSK-3 β reguliert [Phiel et al., 2003].

Im Vergleich zu anderen Proteinkinasen weist die GSK-3 β einige Besonderheiten hinsichtlich ihrer regulatorischen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität auf. In unstimulierten, ruhenden Zellen ist sie aktiv und hält den Großteil ihrer Target-Enzyme durch Phosphorylierung in einem inaktiven Zustand. Im Zuge einer zellulären Antwort auf ein entsprechendes Signal wird sie inaktiviert, was eine Dephosphorylierung (und dadurch eine Aktivierung) ihrer Substrate zur Folge hat. Ihr kommt also die Funktion einer Art „Suppressor-Protein“ zu, das in der ruhenden Zelle für die Inaktivierung seiner Targets sorgt. Hinsichtlich ihrer Substratspezifität ist die GSK-3 β eine der wenigen Kinasen, die geprimte Substrate bevorzugt, also solche Proteine, die bereits eine oder mehrere Phosphatgruppen tragen. Im Falle der GSK-3 β sollte diese Primer-Phosphatgruppe im Abstand von vier Aminosäuren zu der eigentlichen zu phosphorylierenden Aminosäure liegen, wonach eine von der GSK-3 β bevorzugte Priming-Sequenz wie folgt aussieht: Ser/Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Ser-p/Thr-p, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure, Ser/Thr für die von der GSK-3 β zu phosphorylierende Aminosäure, und Ser-p/Thr-p für den geprimten Serin- bzw. Threonin – Rest steht [Fiol et al., 1987]. Eine solche Sequenz wurde z.B. in der Glycogen-Synthase und in der ϵ -Untereinheit des eIF2B gefunden, zwei GSK-3 β - Targets, die über den PI3K-Signalweg (Phosphatidyl-inositol-3-phosphat – Kinase) reguliert werden. Neben dem PI3K - Weg ist die GSK-3 β auch in den Wnt-Signalweg involviert, welcher unter anderem die embryonale Entwicklung von Vertebraten reguliert. Für die hier angesiedelten GSK-3 β - Targets konnte bisher nicht gezeigt werden, dass diese ebenfalls über eine Primer-Phosphatgruppe verfügen müssen [Frame und Cohen, 2001].

4.2.1. Regulation der GSK-3 β - Aktivität

Eine Möglichkeit zur Regulation der GSK-3 β wurde mit der Primer - Phosphatgruppe bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Die GSK-3 β - Aktivität wird in diesem Fall quasi durch jene Kinasen reguliert, welche diese Phosphatgruppe übertragen. Im Falle der Glycogen Synthase ist die CK II (casein kinase II) die „primende“ Kinase [Harwood, A.J, 2001]. Neben dieser „indirekten“ Regulation sorgt eine post-translationale Phosphorylierung an Ser⁹ (Ser²¹ bei GSK-3 α) für eine Inaktivierung (siehe auch Kap. 4.2.2 „Der PI3K-Weg“), und die Phosphorylierung an Tyr²¹⁶ (Tyr²⁷⁹ bei GSK-3 α) für eine Aktivierung der GSK-3 β . Auch die Kontrolle über die intrazelluläre Verteilung der GSK-3 β stellt einen Regulationsmechanismus dar. Denn obwohl die GSK-3 β im allgemeinen als cytosolisches Enzym betrachtet wird, ist sie auch im Nukleus oder den Mitochondrien zu finden, wo sie eine - im Vergleich zur cytosolischen GSK-3 β - höhere Aktivität aufweist [Jope und Johnson, 2004]. Im Laufe des Zellzyklus ändert sich z.B. der Gehalt an nuklearer GSK-3 β , mit einem Maximum in der S-Phase, wodurch die Phosphorylierung von Cyclin D1 durch die GSK-3 β erleichtert wird [Diehl et al., 1998].

Ein im Zusammenhang mit dem Wnt - Signalweg wichtiger Regulationsmechanismus ist die Interaktion der GSK-3 β mit anderen Proteinen. So dienen z.B. Axin (bei der Phosphorylierung von β -catenin) und Presenilin (bei der Phosphorylierung des tau - Proteins) als eine Art „Docking-Proteine“, die das Zusammenspiel von Substraten mit der GSK-3 β (und gegebenenfalls mit primenden Kinasen) erleichtern (siehe auch Kap. 4.2.3 „Der Wnt-Weg“).

4.2.2. Der PI3-Kinase-Weg

Über den Phosphatidyl-inositol-3-phosphat – Kinase –Weg (PI3K-Weg) ist die GSK-3 β an der Regulation der Glykogen-Homöostase und an der Proteinbiosynthese beteiligt. Stimulus-Signale für den PI3K-Weg sind z.B. Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren (u.a. EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor 1)).

In Abbildung 4-3 ist dieser Weg schematisch skizziert: Nach dem Binden von Insulin oder IGF-1 an den Insulin-Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS)-Proteinen, auf Grund derer sich die PI3 Kinase an der Plasma-Membran anlagert und das Second-Messenger-Molekül PIP2 zu PIP3 (Ptdins(3,4,5)P₃) phosphoryliert. PIP3 bindet und lokalisiert die beiden Kinasen PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase1) und

PKB (protein kinase B), welche durch die PDK1 aktiviert wird, an der Plasma-Membran. Die aktive PKB inhibiert schließlich die GSK-3 β durch Phosphorylierung an Ser⁹ (Ser²¹ bei GSK3 α). Als Resultat dieser GSK3-Hemmung kommt es zu einer (partiellen) Dephosphorylierung –und dadurch Aktivierung– der Glykogensynthase und des eIF2B (eukaryotic initiation factor 2B), welches beide Substrate der GSK-3 sind. Dadurch kommt es letztendlich zu einer verstärkten Glykogen- und Proteinsynthese.

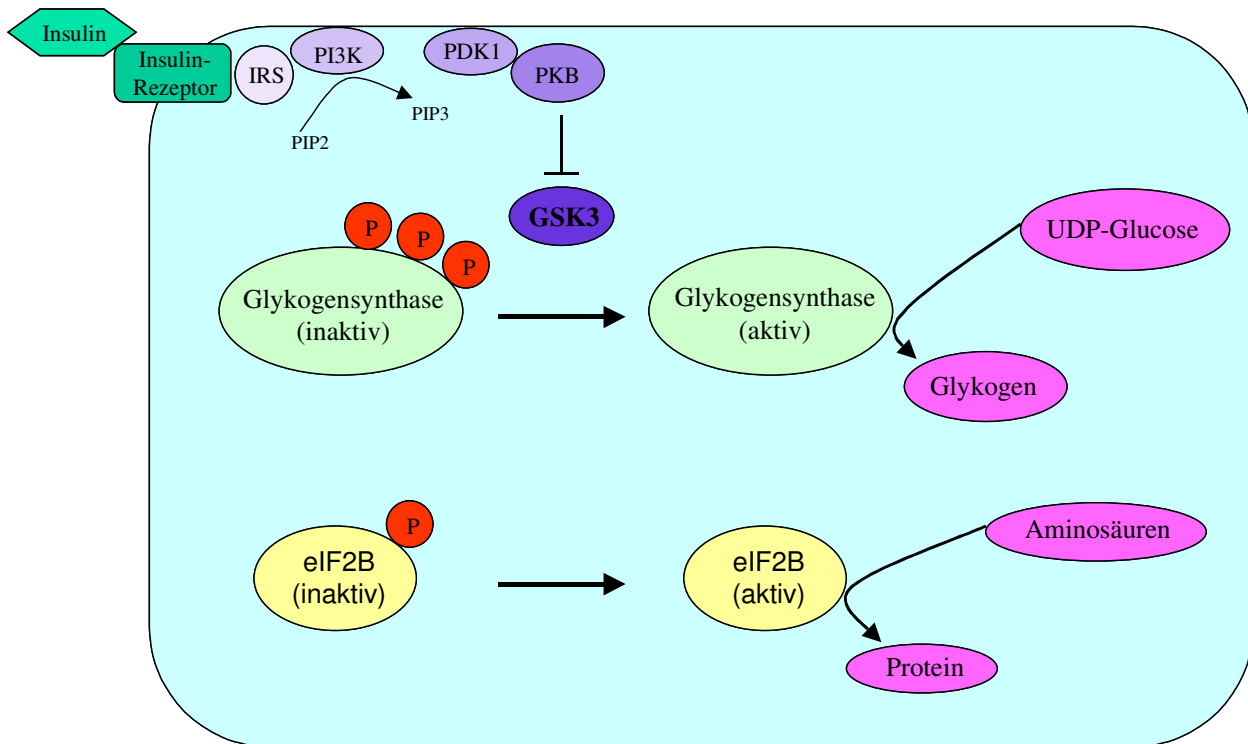


Abbildung 4-3: Über den PI3K-Weg ist die GSK3 an der Regulation der Glykogensynthese und der Proteinbiosynthese beteiligt (Frame et al., 2001).

4.2.3. Der Wnt-Signal-Weg

Der Wnt-Signal-Weg spielt eine zentrale Rolle bei Zellwachstum und –Differenzierung. Es hat sich außerdem gezeigt, dass in zahlreichen Tumor-Zellen solche Gene mutiert sind, die an diesem Signal-Weg beteiligt sind. Eine häufige Gemeinsamkeit dieser Gen-Defekte ist, dass sie zu einer verstärkten Transkription von β -Catenin führen [Polakis, 2000].

Als Bestandteil des Wnt-Signal-Weges liegt die GSK-3 β in einem Multiproteinkomplex vor, welcher unter anderem noch Axin, APC (adenomatous polyposis coli) und β -Catenin enthält.

Im aktiven Zustand, in Abwesenheit eines Wnt-Signales, phosphoryliert die GSK-3 β diese Proteine, wodurch es letztendlich zum Ubiquitin-vermittelten Abbau von β -Catenin im Proteasom kommt. Die Phosphorylierung des Axin scheint dabei den Protein-Komplex zu stabilisieren und als eine Art Gerüst zu dienen, das die Phosphorylierung von β -Catenin durch die GSK-3 β erleichtert. Einige *in vitro* Studien deuten nämlich darauf hin, dass β -Catenin alleine kein geeignetes Substrat für die GSK-3 β ist [Kim und Kimmel, 2000]. Durch die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung wird β -Catenin für den Ubiquitin-vermittelten proteosomalen Abbau markiert. Die Phosphorylierung des APC durch die GSK-3 β scheint dessen Interaktion mit β -Catenin zu erleichtern [Frame und Cohen, 2001].

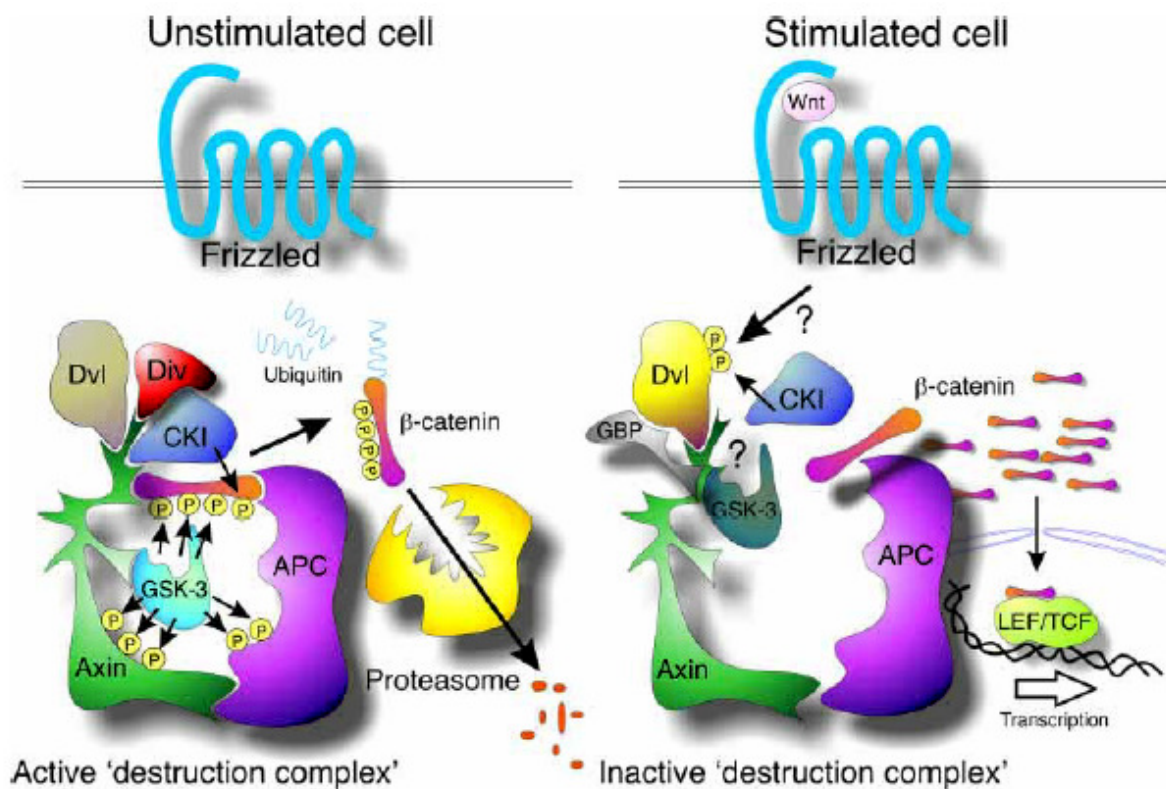


Abbildung 4-4: Beteiligung der GSK-3 am Wnt-Signalweg [Doble et al., 2003] Dvl = Dishevelled; Div = Diversion; CK I = Casein Kinase I; APC = Adenomatous polyposis coli.

Bindet ein Wnt-Protein an den Frizzled-Rezeptor, so kommt es zur Phosphorylierung des Proteins Dishevelled, welches anschließend mit Axin assoziiert und die GSK-3 β - Aktivität hemmt [Polakis, 2000] (siehe Abbildung 4-3). Untersuchungen haben ergeben, dass diese Hemmung jedoch nicht wie beim PI3K-Weg durch eine Phosphorylierung an Ser⁹ zustande kommt, sondern über einen anderen Mechanismus verlaufen muss. Eine mögliche Rolle könnten dabei die zur Familie der GBP (GSK3binding protein) gehörenden Frat-Proteine

(frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas) spielen. Diese stören vermutlich nicht nur durch die Interaktion mit der GSK-3 β , sondern auch durch die Interaktion mit Dishevelled die Bildung des stabilisierenden Multi-Proteinkomplexes, wodurch β -catenin nicht mehr phosphoryliert wird, sich anreichert, und nach Translokation in den Nukleus verschiedene Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF Familie aktiviert. Neben einer Hemmung durch die GBPs wäre auch eine Phosphorylierung der GSK-3 β an einer bisher noch unbekannten Stelle denkbar.

4.3. *STAT-Inhibition*

Signal transducers and activators of transcription (STAT) sind cytosolische Proteine, die für eine Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Nukleus sorgen. Die transduzierten Signale können durch Wachstumsfaktoren oder Cytokine über die entsprechenden Oberflächenrezeptoren ausgelöst werden und führen letztendlich zu einer Bindung der STAT Proteine an die entsprechende Konsensus-Sequenz der DNA, wodurch es zur Expression der entsprechenden Gene kommt. In Säugerzellen wurden bisher sieben verschiedene STAT-Familien identifiziert (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6), denen unterschiedliche Rollen bei der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, der embryonalen Entwicklung, der Organentwicklung und –Funktion, und bei der Regulation der Apoptose und des Immunsystems zukommen [Buettner et al., 2002].

Trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen besitzen die STAT Proteine strukturelle Gemeinsamkeiten (siehe Abbildung 4-4).

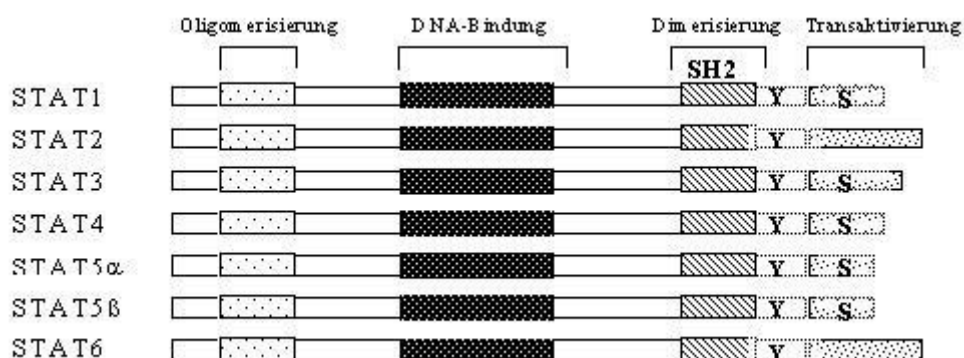


Abbildung 4-5: Schematischer Aufbau der verschiedenen STATs, Erläuterungen siehe Text. [nach Bowman et al, 2000]

Die SH2-Domäne (Src-homology 2) am C-Terminus ist essentiell für die Dimerisierung zweier STAT Proteine. Nur in dieser Form binden die STATs an die DNA-Konsensus-Sequenz. Die Dimerisierung wird durch die Phosphorylierung eines in der Region der SH2-Domäne gelegenen Tyrosinrestes stabilisiert. Weitere Gemeinsamkeiten der STAT-Proteine sind die Region für die Bindung an die DNA, sowie die am N-Terminus gelegene Region für die Tetramerisierung von STAT-Proteinen. Diese Tetramerisierung stabilisiert die Bindung von STATs an einigen schwachen Promotoren und sichert dadurch eine ausreichende Aktivität.

Unterschiede bestehen im Aufbau der Transaktivierungsdomäne, die am äußeren Ende des C-Terminus gelegen ist und letztendlich für die Aktivierung der Transkription notwendig ist. Hier müssen einige STAT-Proteine zusätzlich zur Tyrosinphosphorylierung in der SH2-Region noch an einem Serinrest phosphoryliert werden, um ihre volle Aktivität zu erlangen (z.B. STAT1, 3 und 5) [Bowman et al., 2000].

Die bei allen STAT-Proteinen notwendige Phosphorylierung am Tyrosinrest erfolgt in Abhängigkeit des auslösenden Signals durch intrinsische Tyrosinkinasen des entsprechenden Rezeptors (z.B. EGF-Rezeptor) oder durch Rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen (z.B. JAK am IL-6 Cytokin-Rezeptor). In vielen Tumorzellen erfolgt eine STAT-Aktivierung auch durch nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen wie z.B. Src und Abl.

Der Weg von dem auslösenden Signal bis zur Gen-Expression ist in Abb. 4-5 dargestellt.

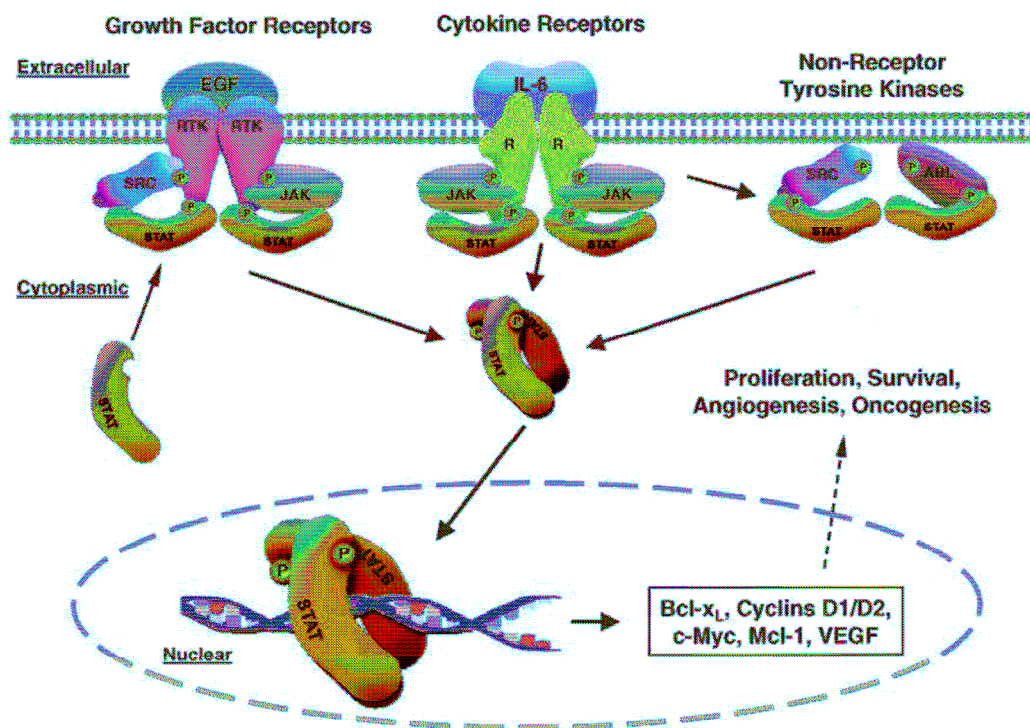


Abbildung 4-6: Mögliche Verlaufswege der Signaltransduktion durch STAT-Proteine; Erläuterungen siehe Text. [Buettner et al. 2002]

Bindet z.B. IL-6 an einen Cytokinrezeptor ohne intrinsische Kinaseaktivität, so dimerisiert der Rezeptor und es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung rezeptorassoziiierter Kinasen der JAK-Familie (Janus Tyrosinkinasen). Diese phosphorylieren wiederum Tyrosinreste an den cytosolständigen Enden des Rezeptors, wodurch Bindungsstellen für monomere, nicht

phosphorylierte STAT-Proteine entstehen. Die gebundenen STAT-Proteine werden anschließend von den JAKs an den SH2-Tyrosinresten phosphoryliert, was zur Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und Bindung an die DNA führt.

Der EGF-Rezeptor als Beispiel für einen Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität kann die STAT-Proteine direkt binden und phosphorylieren oder ebenfalls indirekt über Kinasen der Src oder Jak Familie [Bowman et al., 2000].

Onkogene Tyrosinkinasen wie z.B. Src und Abl können die STAT-Monomere auch unabhängig von einem Rezeptorsignal aktivieren [Buettner et al., 2002]. So kann es zu unkontrollierter STAT-Aktivierung kommen, welche in vielen Tumorzellen beobachtet wird. Aktuellen Studien zufolge ist eine abnorme Erhöhung der STAT-Aktivität, insbesondere STAT3 und STAT5, an der Tumorentstehung und –progression insofern beteiligt, als dass sie die Apoptose verhindert und / oder eine erhöhte Zellproliferation induziert. Interessanterweise ist in einigen Tumorzellen auch die STAT1-Aktivität abnorm erhöht. Dieser STAT-Familie wird eine eher tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben. In STAT1-Knockout Mäusen konnte z.B. ein Verlust der angeborenen Immunität gegen verschiedene virale Krankheiten sowie eine spontane Tumorentwicklung beobachtet werden. Außerdem konnte für STAT1 eine negative Regulation der c-Myc Expression nachgewiesen werden, einem kritischen Regulator des Zellzyklus [Buettner et al., 2002]. Es wird vermutet, dass diese tumorsuppressive Wirkung durch die erhöhte STAT3- und STAT5-Aktivität überdeckt wird [Bowman et al., 2000].

Für die Indirubinderivate E564, E728 und E804 konnte nach 24-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von jeweils 10 μM mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) eine starke Hemmung der STAT3-DNA-Bindung in den humanen Brustkrebszellen MDA-MB-435 und MDA-MB-468, in src-transformierten Mäuse-fibroblasten NIH 3T3 und in der humanen Prostatakrebs-Zelllinie DU145 nachgewiesen werden. In einem *in vitro* kinase assay konnte für E804 außerdem eine direkte Hemmung der Src-Kinase Aktivität mit einem IC_{50} – Wert von 0,43 μM gezeigt werden, sowie eine Reduktion des Gehaltes an phosphoryliertem STAT3 in MDA-MB-468 Zellen (Western-Blot; 30 min. Inkubation; 10 μM). Weiterhin wurde mittels Immunoblot nach 24-stündiger Inkubation mit E804 bei Konzentrationen zwischen 5 μM und 10 μM eine verringerte Expression der antiapoptotischen Proteine Mcl-1 und Survivin nachgewiesen, deren Transkription durch STAT3 veranlasst wird. Außerdem konnte eine sich anschließende Apoptose-Induktion beobachtet werden. [Nam et al., 2005].

4.4. *Inhibition von VEGF-Rezeptor Tyrosinkinasen*

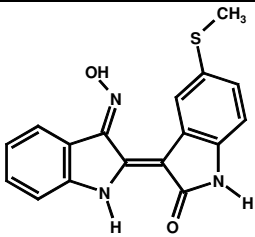
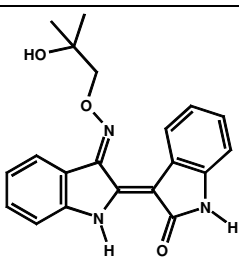
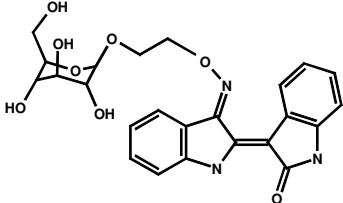
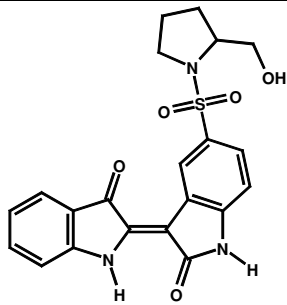
Bei dem VEGF (vascular endothelial growth factor) handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der eine große Bedeutung für die Gefäßneubildung hat. Da die meisten Tumore für ihr Wachstum auf eine ausreichende Blutversorgung angewiesen sind, spielt der VEGF auch eine entscheidende Rolle beim Tumorwachstum. In vielen soliden Tumoren wird eine Überexpression des VEGF-Rezeptors beobachtet [Los et al., 2005].

Der VEGF bindet an die transmembranen Tyrosinkinaserezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2, die auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen exprimiert werden. Ein dritter VEGF-Rezeptor, der VEGFR-3, wird auf embryonalen und adulten Lymphendothelzellen exprimiert und ist somit für die Betrachtung der Gefäßneubildung während des Tumorwachstums von geringerem Interesse.

Bindet ein von einem Tumor exprimierter VEGF an einen entsprechenden VEGFR, kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Kapillaren und zu einem Wachstum von Gefäßendothelzellen bzw. Kapillargefäßen. Eine Hemmung des VEGFR unterbindet diese Gefäßneubildung und vermindert somit die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen, was in einem verringerten Tumorwachstum resultiert [Wedge et al., 2000].

Für verschiedene Indirubinderivate konnte eine hemmende Wirkung auf den VEGFR-2 gezeigt werden, was in Tabelle 4-1 anhand einer kleinen Auswahl an Verbindungen veranschaulicht werden soll. Die Tabelle zeigt auch, dass durch entsprechende Substitution eine Selektivität zwischen der Hemmung des VEGFR und der CDK2/CycE erreicht werden kann (z.B. Nr.3 und 4).

Tabelle 4-1: Vergleich der Hemmung des VEGF-Rezeptors 2 und des CDK2/CyclinE-Komplexes durch verschiedene Indirubin-Derivate anhand des IC₅₀-Wertes [Siemeister et al., 2002]

Nr.	Verbindung	Hemmung des VEGFR-2 [IC ₅₀ , nM]	Hemmung des CDK2/CycE - Komplexes [IC ₅₀ , nM]
1		80	20
2		80	300
3		50	2500
4		300	30

5. Kristallstrukturen

Für die Wirkstoffentwicklung ist es hilfreich, auf Kristallstrukturen der entsprechenden Targets bzw. der Target-Wirkstoff-Komplexe zurückgreifen zu können. Daraus lassen sich oft strukturelle Eigenschaften oder physikochemische Wechselwirkungen herauslesen, die für die Wirksamkeit der Stoffe möglicherweise von Bedeutung sein könnten. So kann z.B. die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erkannt und die Wahrscheinlichkeit von van-der-Waals - oder elektrostatischen Wechselwirkungen in der nahen Umgebung des Wirkstoffes im Target abgeschätzt werden.

Im Folgenden soll die Kristallstruktur der CDK2 bzw. der Komplexe CDK2/E231 und CDK2/E226 und die Kristallstruktur der GSK3 kurz erläutert werden.

5.1. *CDK2*

Die CDK2 besteht aus einer etwa 80 Aminosäuren (AS) umfassenden N-terminalen Domäne, welche vorwiegend aus β -Strängen aufgebaut ist, und einer etwas größeren ca. 210 AS umfassenden C-terminalen Domäne, welche vorwiegend durch α -Helices gebildet wird. Die beiden Domänen sind durch eine sogenannte „hinge-region“ (engl. hinge = Scharnier) so miteinander verbunden, dass sie sich relativ zueinander in geringem Umfang bewegen können.

Wie in Abbildung 5-1 zu erkennen, verfügt die CDK2 über zwei flexible Schleifen, von denen die glycinreiche Schleife über der ATP-Bindungstasche gelegen ist, und die sog. T-Loop die Aminosäure Thr 160 enthält, die zur vollständigen Aktivierung des Enzyms phosphoryliert sein muss. Die sog. PSTAIRE-Helix (siehe die „Ein-Buchstaben-Abkürzungen“ im Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren) enthält die Aminosäure Glu51, die in der aktivierten CDK2 eine Interaktion mit Lys33 eingeht, wodurch die korrekte Einlagerung von ATP in die Bindungstasche erleichtert wird [Brown et al., 1999]. Eine Co-Kristallisation der CDK2 mit den Indirubinderivaten E226 (Indirubin-5-sulfonat) und E231 (Indirubin-3'-oxim) veranschaulicht den Wirkmechanismus der Verbindungen. Die Indirubine binden in die ATP-Bindungstasche des Enzyms, wodurch der eigentliche Phosphatgruppen-Donor, das ATP, nicht mehr aufgenommen werden kann, und dadurch kein Substrat mehr phosphoryliert werden kann.

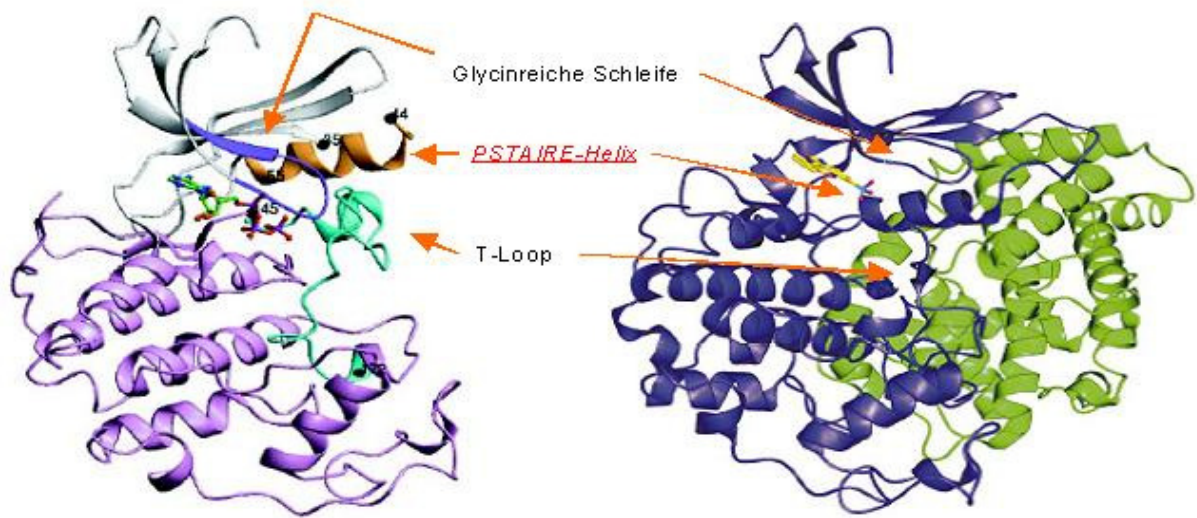


Abbildung 5-1: Links: CDK2 mit ATP [Brown et al., 1999]; rechts: CDK2 mit E226 [Davies et al., 2001]

Mit ihrer durch die 3,2'-Verknüpfung bedingte, leicht geschwungenen Form komplementieren E226 und E231 sehr gut die geschwungene Form der ATP-Bindungstasche. Dort bilden sich H-Brücken zwischen Enzym und Inhibitor, wobei die Lactam-NH-Gruppe als H-Donor zum peptidischen Carbonyl-Sauerstoff von Glu81 und der Lactam-carbonyl-Sauerstoff als H-Akzeptor für die Leu83-NH-Gruppe fungiert. Eine dritte H-Brücke bildet sich zwischen dem NH'-Proton des Inhibitors und dem Backbone-Sauerstoff von Leu83 (Abbildung 5-2). Aufgrund ungünstiger Winkelverhältnisse ist diese dritte H-Brücke allerdings sehr schwach und trägt nur einen sehr geringen Teil zur Bindung an das Enzym bei [Davies et al, 2001].

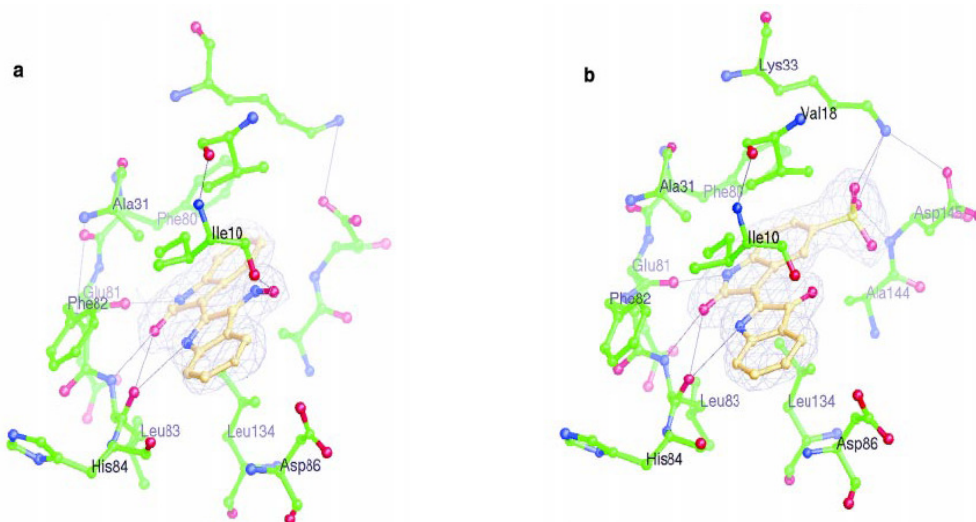


Abbildung 5-2: H-Brückenbindungen zwischen CDK2 und E231 (a) bzw. E226 (b) [Hoessel et al., 1999]

Einen großen Beitrag zur Bindungsaffinität tragen hingegen die hydrophoben van-der-Waals Wechselwirkungen bei, welche sich zwischen dem Ringsystem des Inhibitors und den Aminosäuren Val18, Ala31 und Leu134 ausbilden. C6 und C7 des Inhibitors befinden sich in räumlicher Nähe zu Phe80, während die Ringatome C4' – C6' ein Stück aus der Bindungstasche hinaus in einen hydrophoben Tunnel bestehend aus den Aminosäuren Phe82, Ile10 und dem Alkyl-Rest von Lys89 ragen [Davies et al., 2001].

Ein Vergleich der Position von E226 mit der Position von ATP in der CDK2 zeigt, dass die Sulfonat-Gruppe in dem Bereich liegt, in welchem sich auch die α -Phosphat-Gruppe des ATP befindet (Abbildung 5-3). Dort interagiert sie über elektrostatische Wechselwirkungen mit Lys33, Asn132 und Asp145. Dadurch kommt es zu einer Veränderung in der Lage des sog. DFG-Motivs (Asp145, Phe146 und Gly147), einer bei Protein-Kinasen weit verbreiteten Aminosäuren-Sequenz. Durch diese Bewegung des DFG-Motivs befindet es sich in einer ähnlichen Position wie in der aktiven, mit Cyclin A assoziierten Form der CDK2. Durch das Fehlen eines entsprechenden Substituenten in 5-Position führt die Bindung von E231 zu keiner Veränderung dieses DFG-Motivs. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass E226 im Vergleich zu E231 an der isolierten CDK2 eine wesentlich höhere Aktivität (IC_{50} E226: 0,035 μ M; IC_{50} E231: 0,44 μ M) aufweist [Hössel et al., 1999].

Der Vergleich der Positionen von E231 und ATP in der CDK2-Bindungstasche zeigt weiterhin, dass die Oxim-Gruppe in der Region des Ribose-Restes des ATP liegt, jedoch keinerlei Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht. Da in diesem Bereich des Enzyms also naturgemäß genug Raum für ein Molekül mit ähnlicher Größe der Ribose vorhanden ist, scheint dies eine geeignete Position zu sein, um Substituenten einzuführen, die zu einer besseren Wasserlöslichkeit des von Natur aus sehr hydrophoben Indirubin-Grundgerüsts führen könnten, z.B. OH-Gruppen tragende Reste wie Zucker oder Alkohole.

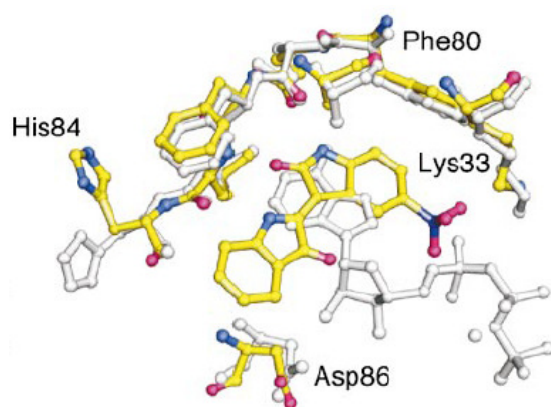


Abbildung 5-3: Bindungstasche der CDK2 mit eingelagertem ATP (weiss) und E226 (gelb)
[Davies et al., 2001]

Der Vergleich des Komplexes CDK2/Inhibitor (monomerer Komplex) mit dem Komplex CDK2^{Thr160-P}/Cyclin A/Inhibitor (binärer Komplex) zeigt, dass sich die beiden Domänen der CDK2 durch die Assoziation mit Cyclin A leicht auseinander bewegen. Dies hat jedoch auf die Lage der Aminosäuren in der direkten Umgebung der Bindungstasche keinen Einfluss, so dass auch die Wechselwirkungen des Inhibitors mit dem Enzym durch die Assoziation nicht beeinflusst werden. Lediglich die Lage der Aminosäuren außerhalb der Bindungstasche verändert sich in geringem Umfang [Davies et al., 2001] (Abbildung 5-4).

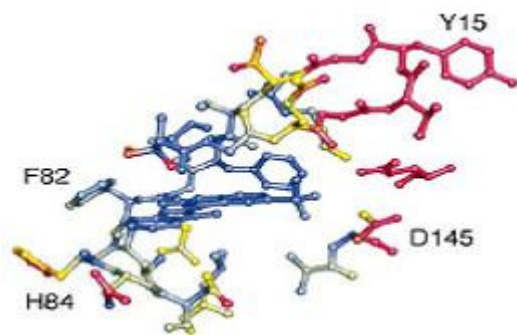


Abbildung 5-4: Veränderung der Position von Aminosäuren im Vergleich monomere und binäre CDK2 mit E226:

Blau: Veränderungen < 0,5 Å

Rot: Veränderungen > 2,5 Å

[Davies et al., 2001]

Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse des CDK2/CycA Komplexes deuten darauf hin, dass die Positionen 5 und 3' in besonderem Maße dazu geeignet sind, das Indirubin-Grundgerüst durch das Einbringen geeigneter Substituenten zu variieren und dadurch z.B. deren Wasserlöslichkeit zu erhöhen.

5.2. GSK-3 β

Wie auch die CDK2 besteht die GSK-3 β aus einer N-terminalen Domäne mit vorwiegend β -Faltblatt-Struktur und einer C-terminalen Domäne mit vorwiegend α -helicaler Struktur (Abbildung 5-5). Dazwischen liegt die Substratbindungstasche, die von einer glycinreichen Schleife und der hinge region umgeben ist. Diese stellt wie bei der CDK2 das Scharnier dar, um das sich die beiden N- und C-terminalen Teile des Enzyms bewegen können, um dem Substrat den Weg in die Bindungstasche zu öffnen.

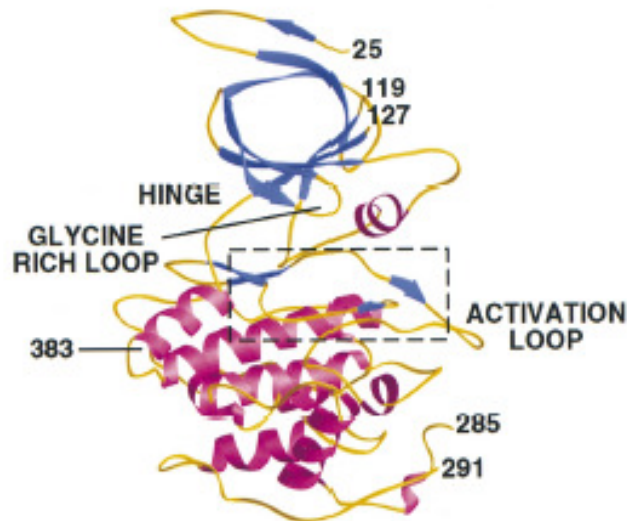


Abbildung 5-4: Die GSK3- β ist analog der CDK2 aufgebaut: Die N-terminale Domäne besteht vorwiegend aus β -Faltblatt-Strukturen, während die C-terminale Domäne vorwiegend α -helicale Struktur hat. Über der Bindungstasche liegt die glycinreiche Schleife und die Activation Loop [ter Haar et al., 2001]

Entlang dieser Bindungstasche erstreckt sich die „activation loop“ mit der Aminosäure Tyr216, deren Seitenkette den Zugang zur Bindungstasche blockiert. Die Phosphorylierung von Tyr216 führt zu einer über 200-fach höheren Enzym-Aktivität, da sie eine Bewegung der activation loop bewirkt, welche dem Substrat einen besseren Zugang zur Bindungstasche ermöglicht. Dieser strukturelle Zustand wird beispielsweise auch bei der aktivierten, substratgebunden CDK2 vorgefunden. So stimmen die Positionen der Aminosäuren Arg96, Arg180 und Lys205 der GSK-3 β mit den Positionen der entsprechenden Aminosäuren der aktivierten CDK2 gut überein [ter Haar et al., 2001].

Anhand einer Co-Kristallisation der GSK-3 β mit 6-Brom-indirubin-3'-oxim (BIO) konnten Meijer et al. zeigen, dass der Inhibitor analog zum Bindungsmuster in der CDK2 auch hier in die ATP-Bindungstasche bindet [Meijer et al., 2003]. Die Bindungs-Affinität der Indirubine beruht auch bei der GSK-3 β zum Großteil auf apolaren van-der-Waals-Wechselwirkungen, welche zwischen 66% und 92% der gesamten Bindungsenergie ausmachen [Polychronopoulos et al., 2004]. H-Brückenbindungen bilden sich jeweils aus zwischen dem NH' des Indirubins und dem Carbonyl-O von Asp133, zwischen dem NH des Lactam-Ringes und dem Carbonyl-O von Val135 und zwischen dem Carbonyl-O des Lactam-Ringes und der amidischen NH-Gruppe von Val135 [Meijer et al., 2003] (Abbildung 5-6). Diese H-Brückenbindungen sowie eventuell vorhandene elektrostatische Wechselwirkungen spielen aber im Vergleich zu den erwähnten van-der-Waals Wechselwirkungen eine wesentlich geringere Rolle. Lediglich bei Indirubinoxim-Derivaten vermutet man eine stabilisierende

elektrostatische Wechselwirkung der Oxim-Gruppe auf den Enzym/Inhibitor-Komplex, da bei diesen Derivaten eine durchgängig höhere Hemmwirkung als bei den entsprechenden Derivaten ohne Oxim-Gruppe beobachtet werden kann [Polychronopoulos et al., 2004]. Dies wurde sowohl an der GSK-3 β als auch an dem CDK1/CycB-Komplex beobachtet [Tabelle 5-1].

Tabelle 5-1: Vergleich der IC₅₀-Werte von Indirubin-Derivaten und deren entsprechenden 3'-oxim-Derivaten an GSK3 β und dem CDK1/CyclinB-Komplex [Polychronopoulos et al., 2004]

Verbindung	IC ₅₀ an GSK-3 β [μ M]	IC ₅₀ an CDK1/CycB [μ M]
Indirubin	1,000	10,00
Indirubin-3'-oxim	0,022	0,180
6-Bromindirubin	0,045	>100
6-Bromindirubin-3'-oxim	0,005	0,320
6-Chloroindirubin	0,140	>100
6-Chloroindirubin-3'-oxim	0,020	0,650

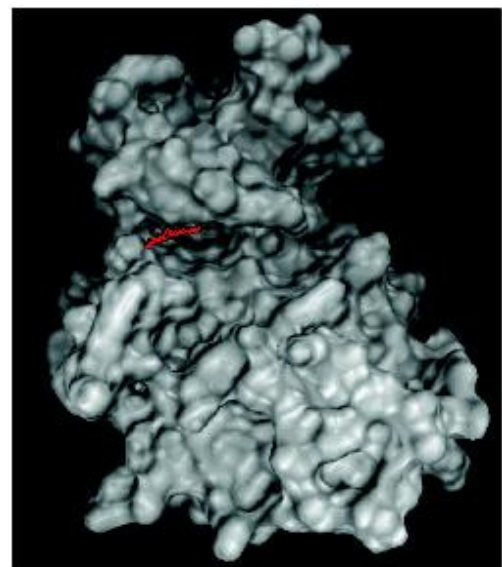
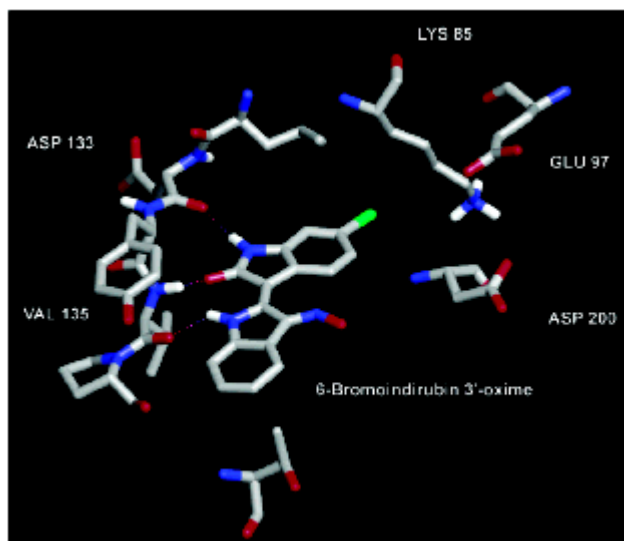


Abbildung 5-5: 6-Bromo-indirubin-3'-oxim (BIO) im Komplex mit GSK3- β . Rechts: BIO (rot) liegt in der ATP Bindungstasche der GSK3- β . Links: H-Brücken zwischen BIO und Aminosäuren der Bindungstasche [Polychronopoulos et al., 2004]

Für BIO konnte eine im Vergleich zum CDK2/CycA-Komplex (IC₅₀: 0,30 μ M) sehr viel stärkere Hemmung an der GSK-3 β (IC₅₀: 0,005 μ M) nachgewiesen werden. Dies liegt

vermutlich darin begründet, dass die Umgebung in direkter Nachbarschaft des Brom-Substituenten durch unterschiedliche Aminosäuren gebildet wird: Während in der GSK-3 β die Aminosäure Leu132 in direkter Nachbarschaft zum Brom des BIO liegt, wird dieser Raum in der CDK2 durch die sterisch anspruchsvollere Aminosäure Phe80 eingenommen (siehe Abbildung 5-7). Somit bleibt hier weniger Platz für den sterisch ebenfalls anspruchsvollen Brom-Substituenten. Diese Erkenntnis könnte für die Entwicklung selektiver Inhibitoren von großer Bedeutung sein.

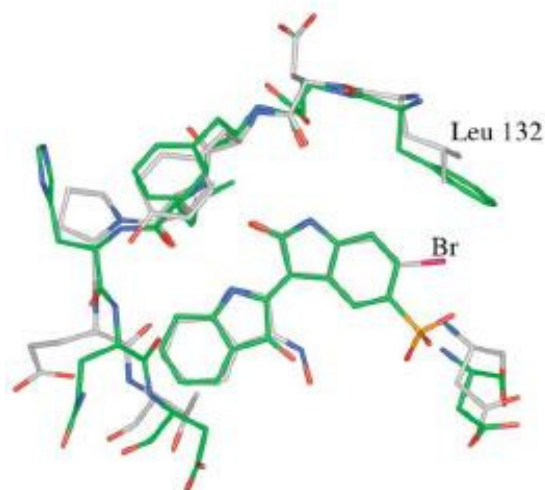


Abbildung 5-7: Überlagerung der Komplexe CDK2/CycA/E226 (grün) und GSK3- β /BIO (weiß). Anstelle von Leu132 befindet sich im CDK2/CycA-Komplex das sterisch aufwendigere Phe80 in direkter Nachbarschaft zum Brom-Substituenten [Meijer et al., 2003]

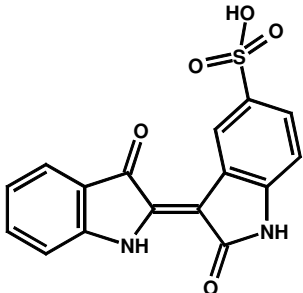
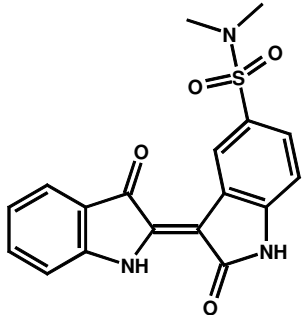
5.3. Intermolekulare Wasserstoffbrücken

Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Indirubinmolekülen spielen eine wichtige Rolle für die Löslichkeit dieser Substanzklasse. Aufgrund der planaren Struktur der Verbindungen können durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen den Lactam-Sauerstoff und Wasserstoff-Atomen Schichten-Strukturen entstehen [Pandraud, 1961]. Diese ordnen sich durch hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Ringsysteme und durch Ausbildung weiterer Wasserstoffbrückenbindungen auch schichtweise übereinander an. Dies führt letztendlich zu einer Kristallstruktur, in der planare Molekülschichten aneinander haften, woher auch der hohe Schmelzpunkt des Indirubins rührt [Jautelat, 2005].

6. Problemstellung

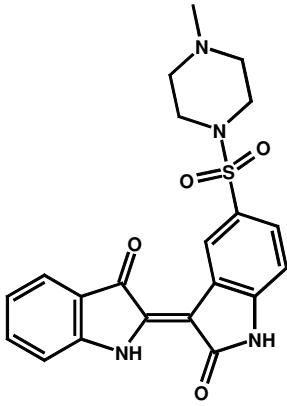
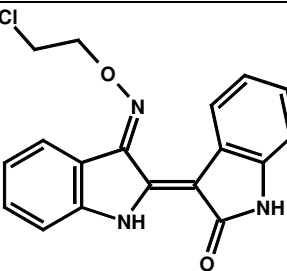
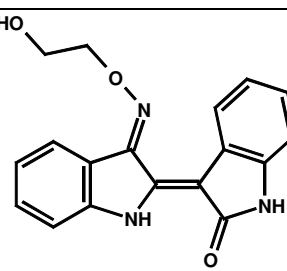
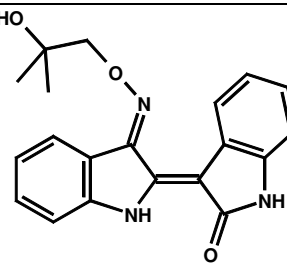
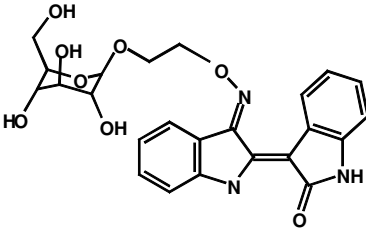
In bisherigen Arbeiten im Arbeitskreis wurden bereits zahlreiche Indirubin-Derivate synthetisiert. Diese wurden zunächst auf die Hemmung von CDKs und - um die Wirkung auf Tumorgewebe abschätzen zu können - auf Wachstumshemmung an Tumorzellen untersucht [Hoessel 1999, Thommet 2001 und Schwahn 2004], wobei meist an der MCF-7 Zelllinie untersucht wurde, einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie. Tabelle 6-1 zeigt einige ausgewählte Verbindungen, die als potente CDK-Inhibitoren aus diesen Arbeiten hervorgingen.

Tabelle 6-1: Einige bereits im Arbeitskreis entwickelte Indirubin-Derivate und ihre inhibitorische Aktivität am CDK2/CycE-Komplex bzw. an der Tumorzelllinie MCF-7, sowie ihre Wasserlöslichkeit

E- Nummer	Strukturformel	IC ₅₀ [μM] CDK2/CycE	IC ₅₀ [μM] MCF-7	Wasserlöslichkeit [mg/l]
E226		0,6	> 30	k.D. *
E233		0,03	> 10	< 2

* keine Daten vorhanden

Tabelle 6-1 (Forts.): Einige bereits im Arbeitskreis entwickelte Indirubin-Derivate und ihre inhibitorische Aktivität am CDK2/CycE-Komplex bzw. an der Tumorzelllinie MCF-7, sowie ihre Wasserlöslichkeit

E684		0,1	7	1,2
E681		0,3	0,6	k.D. *
E246		0,3	2,3	< 1
E565		0,3	1,5	3
E671		1,7	4	23

* keine Daten vorhanden

Um für einen therapeutischen Einsatz als Antitumor-Wirkstoff geeignet zu sein, muss für die entwickelten Indirubin-Derivate neben den inhibitorischen Eigenschaften auf Enzymaktivität

und Tumorzellwachstum auch eine adäquate Bioverfügbarkeit erreicht werden, so dass sie im Körper an ihren Wirkungsort gelangen können.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit besteht in einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit, was im Rahmen dieser Arbeit unter anderem durch das Einbringen von Hydroxylgruppen-haltigen Substituenten in das Indirubin-Gerüst erreicht werden soll.

Tabelle 6-1 zeigt, dass die Wasserlöslichkeit bei den aufgeführten Verbindungen mit Werten von meist 1 mg/l bis 3 mg/l gering ist. Lediglich Verbindung E671 zeigt mit einem Wert von 23 mg/l eine höhere Löslichkeit. Jedoch zeigt E671 unter den aufgeführten Verbindungen mit einem IC_{50} -Wert von 1,7 μM die schwächste Inhibition des CDK2/CycE – Komplexes.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun durch das Einbringen geeigneter Substituenten oder einer Kombination zweier Substituenten in Position 3' und 5 des Indirubin-Gerüsts (siehe Abbildung 6-1) solche Derivate entwickelt werden, die bei starker biologischer Aktivität gleichzeitig über eine verbesserte Wasserlöslichkeit verfügen.

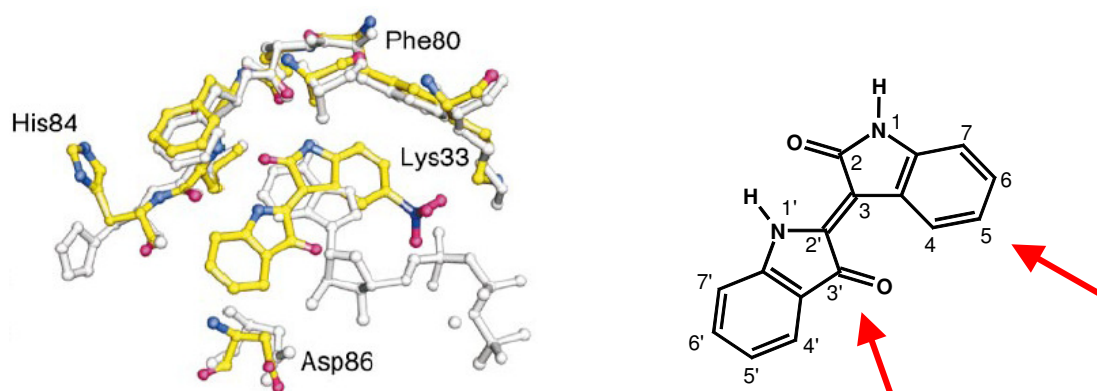


Abbildung 6-1: Die Positionen 5 und 3' sind für die Einführung von Substituenten besonders geeignet (siehe auch Kapitel 5 „Kristallstrukturen“)

Einige geeignete Arten von Substituenten können bereits aus Tabelle 6.1 abgeleitet werden. So verfügen E233 und E684 mit einem Sulfonamid-Substituenten in Position 5 über eine potente Hemmwirkung am CDK2/CycE – Komplex, zeigen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Cytotoxizität. Die Verbindungen E681, E246 und E565, die über eine Alkyl-oximether Funktion in Position 3' verfügen, zeigen sowohl eine starke Hemmung der CDK2 als auch eine starke Cytotoxizität. Dies scheint eine geeignete Position, ähnlich große, jedoch

mehrfach hydroxylierte Substituenten einzuführen, um bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität möglicherweise eine erhöhte Wasserlöslichkeit zu erzielen.

Die im Vergleich zu den aufgeführten Verbindungen schwächere Inhibition der CDK2 bei E671 könnte evtl. durch Kombination mit einer Sulfonamidgruppe in Position 5 kompensiert werden.

Die neu synthetisierten Derivate sollen auf ihre inhibitorische Wirkung auf den CDK2/Cyc E Komplex untersucht werden, da dieser, wie bereits im Kapitel 4.1 erwähnt, essentiell für den Übergang aus der G1- in die S-Phase ist.

Da sich viele Indirubine auch als potente GSK-3 β -Inhibitoren erwiesen haben und dieses Enzym an zahlreichen biochemischen Signalwegen beteiligt ist, welche in unterschiedlichen Tumorzellen dereguliert sind, sollen die synthetisierten Verbindungen auch auf Wirksamkeit an diesem Protein untersucht werden.

Weiterhin sollen die neuen Verbindungen auf ihre Wasserlöslichkeit und ihre cytotoxischen Eigenschaften an der MCF-7 Zelllinie untersucht werden.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Grundlegende Syntheseverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Indirubin-Derivate mit Substituenten in den Positionen 3' und 5 entwickelt. Im Arbeitskreis wurden bis dato bereits zahlreiche Indirubinderivate synthetisiert. Für die in dieser Arbeit dargestellten Derivate haben sich dabei die folgenden grundsätzlichen Syntheseverfahren als geeignet erwiesen:

7.1.1. Kondensation von Isatin und Indoxylacetat

Adolf von Baeyer beschrieb 1881 die Bildung von Indirubin durch die Kondensation von Indoxyl und Isatin in alkoholischer Natroncarbonatlösung [Baeyer, 1881]. Die im Arbeitskreis angewandte Methode (Abb. 7-1) beruht auf einer Variante dieses Verfahrens, welche 1969 von Russell und Kaupp veröffentlicht wurde [Russell und Kaupp, 1969].

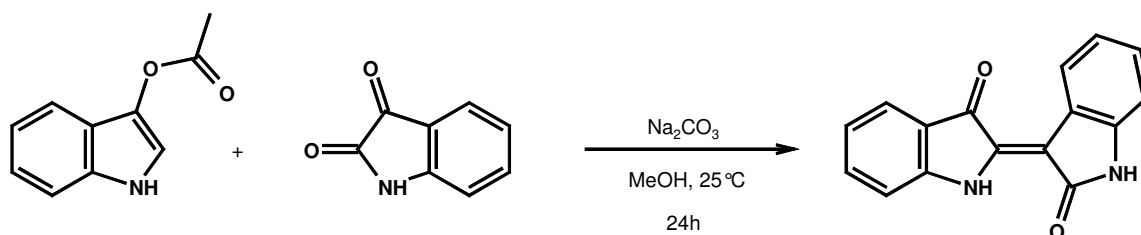


Abbildung 7-1: Synthese von Indirubin aus Indoxyl und Isatin

7.1.2. Synthese von Indirubin-3'-oxim

Die Synthese von Indirubin-3'-oxim wird nach einer Patentvorschrift der Farbwerke, vorm. Meister, Lucius & Brüning, durchgeführt [Farbwerke 1913]. Dabei wird das entsprechende Indirubinderivat in Pyridin mit Hydroxylaminhydrochlorid versetzt und zum Sieden erhitzt (Abb. 7-2).

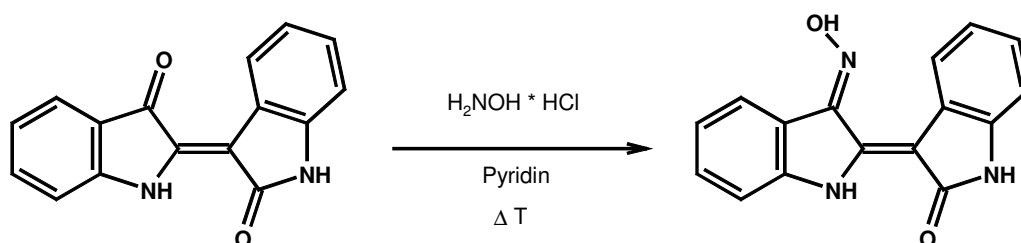


Abbildung 7-2: Synthese von Indirubin-3'-oxim

7.1.3. Synthese von Indirubin-3'-oximether – Derivaten

Die Synthese von Indirubin-3'-oximether – Derivaten basiert auf einem Verfahren von Li et al. (1996), bei dem Indirubin-3'-oxim in wässriger NaOH-Lösung mit Chloralkanolen in der Siedehitze umgesetzt wurde. In unserem Arbeitskreis wurde die Synthese so modifiziert, dass als Base nun das organische Tetramethylguanidin (TMG), und als Solvens Ethanol dient.

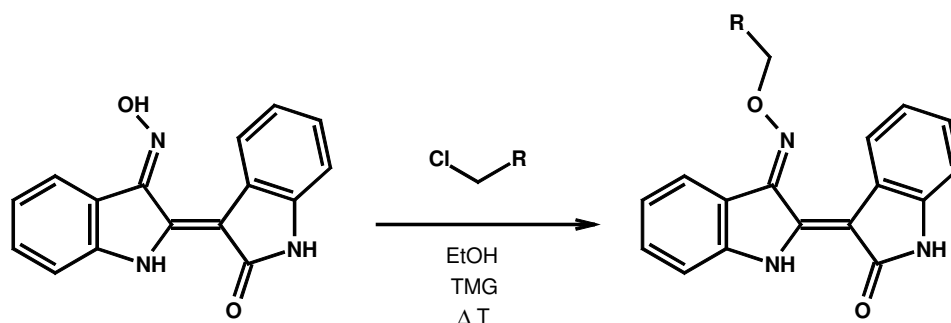


Abbildung 7-3: Synthese von Indirubin-3'-oximether-Derivaten

7.2. Ergebnisse der Synthesen

7.2.1. Synthese der Indirubin-sulfonsäure-Derivate

Als geeignete Methode für die Synthese der Indirubin-sulfonsäure-Derivate hat sich ein von Schwahn entwickelter Syntheseweg erwiesen [Schwahn, 2004]. Den Ausgangspunkt bildet das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure, das durch Kondensation von Indoxylacetat und dem Natriumsalz der (käuflich erwerblichen) Isatin-5-sulfonsäure in Methanol mit Natriumcarbonat erhalten wird.

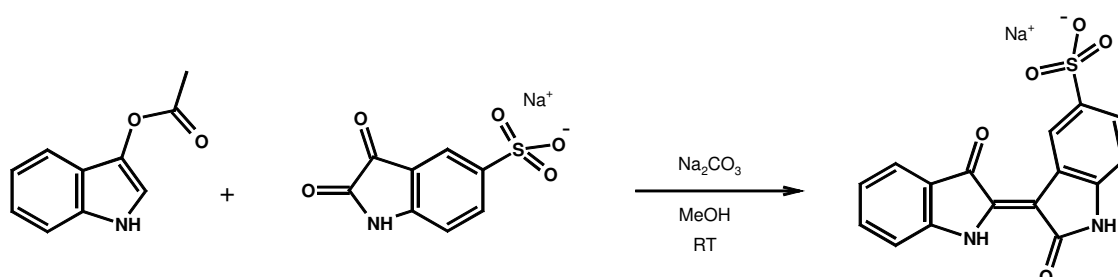


Abbildung 7-4: Kondensation von Indoxylacetat und Isatin-5-sulfonat zum Indirubin-5-sulfonat

Der nächste Schritt besteht in der Bildung des Sulfonsäurechlorids. Dafür wird das Sulfonat unter Zusatz einer katalytischen Menge Dimethylformamid (DMF) mehrere Stunden in siedendem Thionylchlorid gerührt.

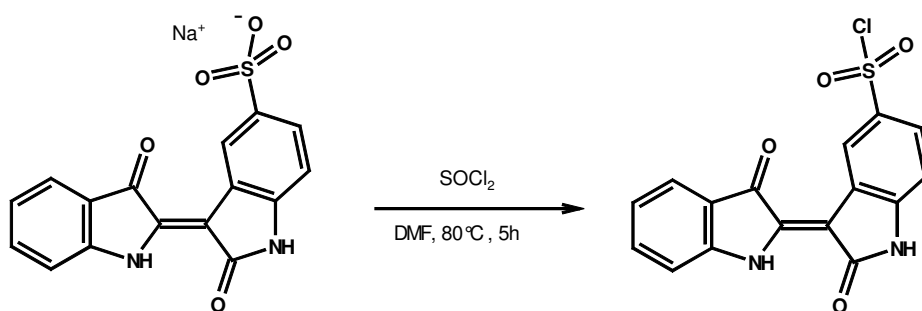


Abbildung 7-5: Chlorierung des Indirubin-5-sulfonats zum Indirubin-5-sulfonsäurechlorid

Zur Synthese der Sulfonamide werden die Säurechloride schließlich mit einem Überschuss einer wässrigen, 15-20%-igen Lösung des entsprechendenamins versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Verwendung einer wässrigen Amin-Lösung stellt sicher, dass das schwerlösliche Produkt ausfällt. Das Säurechlorid ist dabei auch in wässriger Lösung stabil genug, um die Reaktionsdauer von etwa 24 h durchzustehen.

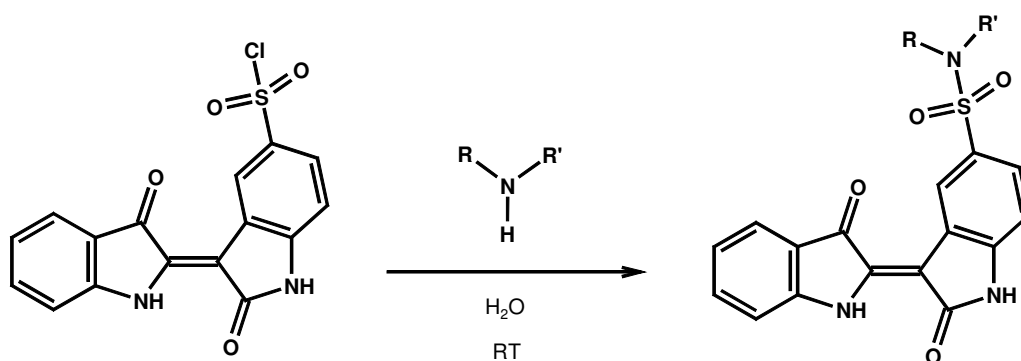


Abbildung 7-6: Darstellung der Indirubin-5-sulfonsäureamide aus Indirubin-5-sulfonsäurechlorid

In der vorliegenden Arbeit wurden nach dieser Vorgehensweise das 5-(Piperidino-sulfonyl-)indirubin und das 5-(Pyrrolidino-sulfonyl-)indirubin synthetisiert.

Tabelle 7-1: Synthese-Ausbeuten der 5-Amino-sulfonyl-indirubin- -Derivate

Substanz	Ausbeute
5-(Piperidino-sulfonyl-)indirubin (E800)	39%
5-(Pyrrolidino-sulfonyl-)indirubin (E801)	51%

7.2.2. Synthese der 3'-Hydroxyimino-5-sulfonamid-Derivate

Die Synthese der 3'-Oxim-Derivate von in Position 5 substituierten Indirubin-Derivaten wurde bereits von Schwahn im Arbeitskreis etabliert [Schwahn, 2004]. Dabei wird das entsprechende Indirubin-Derivat in Pyridin bei ca. 100°C mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zum entsprechenden Oxim umgesetzt.

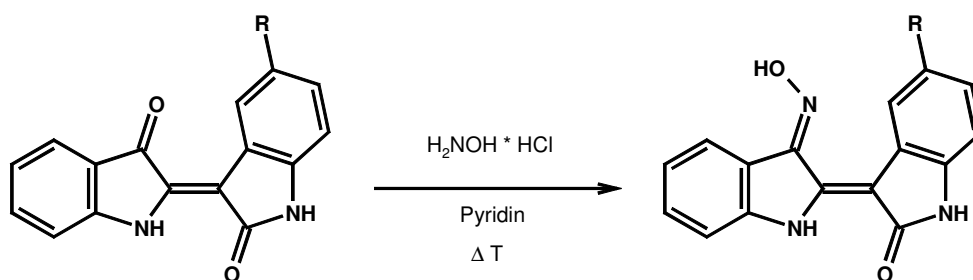


Abbildung 7-7: Darstellung der Indirubin-3'-oxim-Derivate aus dem entsprechenden Indirubin-Derivat und Hydroxylamin-Hydrochlorid

Tabelle 7-2: Synthese-Ausbeuten der Oxim-Derivate der Sulfonsäureamide

Substanz	Ausbeute
5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-oxim (E812)	82%
5-(Pyrrolidino-sulfonyl)-indirubin-3'-oxim (E802)	80%

7.2.3. Synthese der Indirubin-3'-oximether-Derivate

Zur Synthese der Indirubin-3'-oximether-Derivate werden die entsprechenden Oxim-Derivate in Ethanol mit den entsprechenden Halogen-Alkanen umgesetzt. Als Hilfsbase wird TMG (Tetramethylguanidin) verwendet.

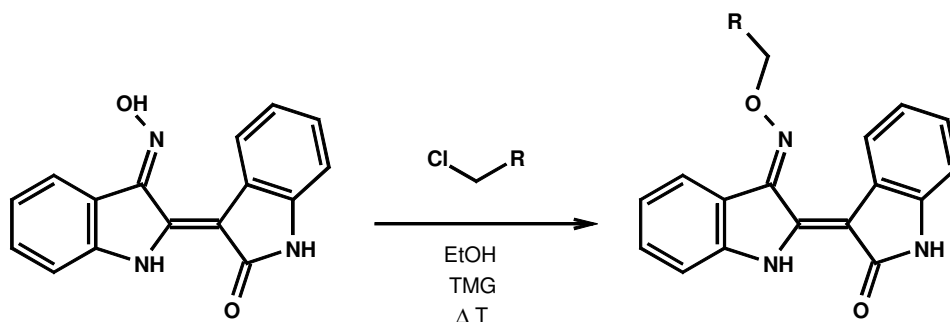


Abbildung 7-8: Darstellung der Indirubin-3'-oximether-Derivate durch Kondensation der Oxime mit Halogen-Alkanen

Tabelle 7-3: Synthese-Ausbeuten der Indirubin-3'-oximether-Derivate

Substanz	Ausbeute
Indirubin-(4-hydroxybutyl)-oximether (E803)	68%
Indirubin-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether (E804)	44%

Die schlechtere Ausbeute bei dem (2,3-Dihydroxypropyl)-ether lässt sich vermutlich durch dessen bessere Löslichkeit in Ethanol erklären. Dadurch fällt nach Abkühlung des Reaktionsansatzes entsprechend weniger Produkt aus.

7.2.4. Synthese der Indirubin-Derivate mit einer Acetamid-Gruppe in Position 3'

Die zur Synthese dieser Indirubin-Derivate notwendigen Chloracet-alkanolamide wurden durch die Reaktion von Chloressigsäurechlorid mit Ethanolamin bzw. Diethanolamin erhalten. Bei der Gestaltung der Synthese wurde berücksichtigt, dass sich die Ethanolamine in Wasser gut lösen, Chloressigsäurechlorid jedoch in Wasser nicht sehr stabil ist. Somit wird diese Reaktion in einem 2-Phasen-System durchgeführt, welches aus einer wässrigen NaHCO_3 -Lösung und CH_2Cl_2 besteht. Das Ethanolamin wird in der wässrigen Phase gelöst, die Mischung nach Zugabe von CH_2Cl_2 mit Eis abgekühlt, und Chloressigsäurechlorid langsam zugetropft. Nach mehreren Stunden Rühren wird das Produkt mit Essigsäureethylester aus der wässrigen Phase extrahiert.

Die Ausbeuten dieser Reaktion sind allerdings nur sehr gering. Dies liegt vermutlich daran, dass sich das Chloressigsäurechlorid in dem 2-Phasen-System zersetzt, und/oder sich das Produkt außerdem schlecht aus der wässrigen Phase extrahieren lässt.

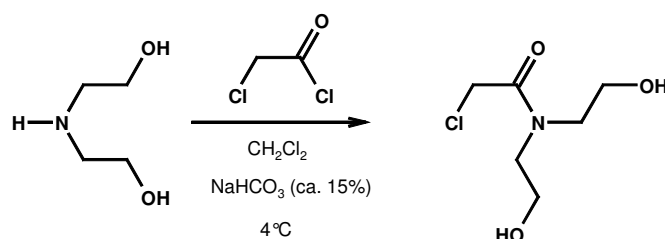


Abbildung 7-9: Darstellung des Chloracet-ethanol bzw. -diethanolamids

Tabelle 7-4: Synthese-Ausbeuten der Chloracetamide

Substanz	Ausbeute
Chloressigsäure-ethanolamid	8%
Chloressigsäure-diethanolamid	6%

Die Chloracetamid-Substituenten werden analog der Chloralkanole mit Indirubin-3'-oxim verknüpft.

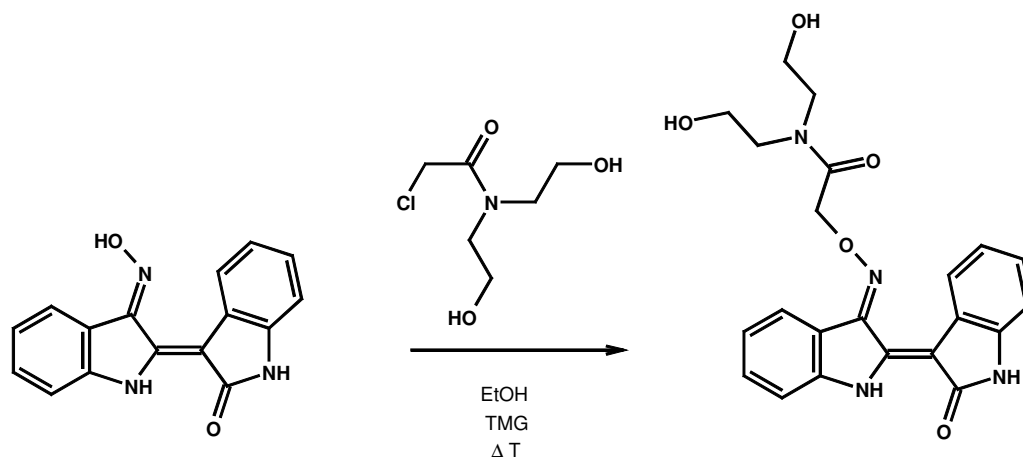


Abbildung 7-10: Kondensation der Chloracetamide mit Indirubin-3'-oxim

Tabelle 7-5: Synthese-Ausbeuten der Acetamid-verknüpften Indirubin-3'-oxim-Derivate

Substanz	Ausbeute
3'-[(2-Hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino]-indirubin (E805)	73%
3'-[Bis-(2-hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino]-indirubin (E806)	66%

Auch hier könnte der Grund für die schlechtere Ausbeute von E806 wieder die bessere Wasserlöslichkeit des Diethanolamid-Derivates sein.

7.2.5. Synthese der 5-(Amino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether-Derivate

Als praktikable Möglichkeit, das Indirubin-3'-oxim mit einem Glucoserest zu verknüpfen, hat sich die Verwendung eines halogenierten Spacers erwiesen, an den die Glucose gebunden ist [Schwahn, 2004]. Durch den Spacer kann die Verknüpfung mit dem Indirubin-3'-oxim auf die gleiche Weise erfolgen, wie mit den vorher beschriebenen halogenierten Alkoholen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ethyl-Spacer verwendet.

7.2.5.1. Synthese des 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*- β -D-glucopyranosids

Die Synthese des 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*- β -D-glucopyranosids verläuft nach dem Prinzip der Königs-Knorr-Methode, das auf der Verknüpfung von halogenierten Zuckerresten mit Nukleophilen (meist Alkoholen) beruht. Die halogenierten Zucker werden am C1-Atom durch den Einsatz verschiedener Schwermetall-Salze wie z.B. Quecksilbercyanid, Silbernitrat oder Silbercarbonat aktiviert, wodurch dieses leicht von dem Nukleophil angegriffen wird. Eine Stereoselektivität wird bei dieser Reaktion durch geeignete Nachbargruppen zum C1-Atom erreicht, welche einen Angriff des Nukleophils von der „Unterseite“, also der α -Position des Zuckermoleküls verhindern sollen. Häufig werden dabei O-Acyl-Substituenten wie die Acetatgruppe eingesetzt [Paulsen, 1982]. Abbildung 7-11 verdeutlicht dieses Prinzip.

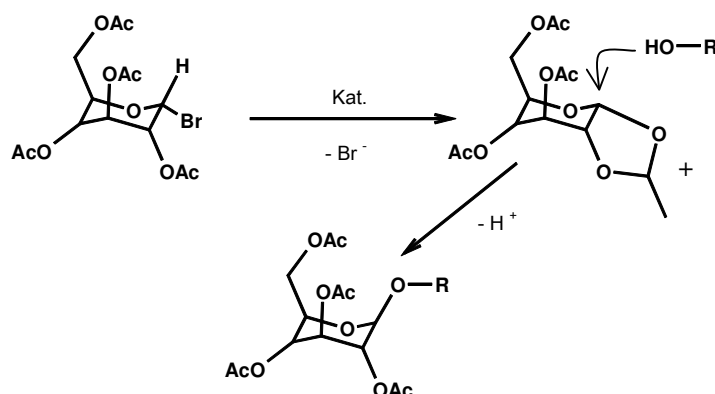


Abbildung 7-11: Bildung von β -glycosidischen Verbindungen aus α -D-Bromacetoglucose nach der Königs-Knorr Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrte Verknüpfung der Glucose mit dem Ethyl-Spacer verläuft nach einer Vorschrift von Thomas und Iyengar [1999]. Dabei wird tetra-acetylierte α -D-Bromglucose in 2-Bromethanol gelöst, welches bei dieser Reaktion sowohl als Solvens als auch als Reaktionspartner fungiert. Als Katalysator dient Silbercarbonat.

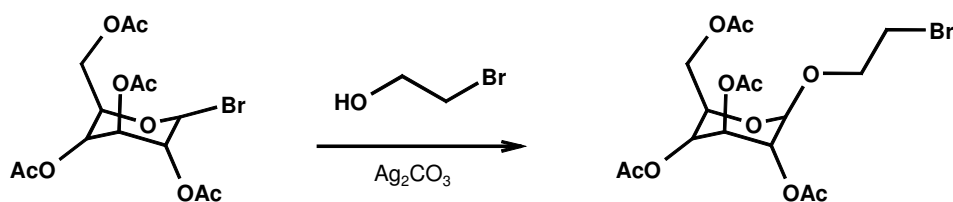


Abbildung 7-12: Darstellung der 2-Bromethyl β -D-tetraaceto-glucopyranose

Ausbeute: 48%

7.2.5.2. Verknüpfung des 2-Bromethyl-*tetra-o-acetyl*- β -D-glucopyranosids mit Indirubin-3'-oxim-Derivaten

Die anschließende Verknüpfung mit dem Indirubin-3'-oxim verläuft dann analog zu dem bereits vorher beschriebenen Verfahren in Ethanol mit TMG als Hilfsbase.

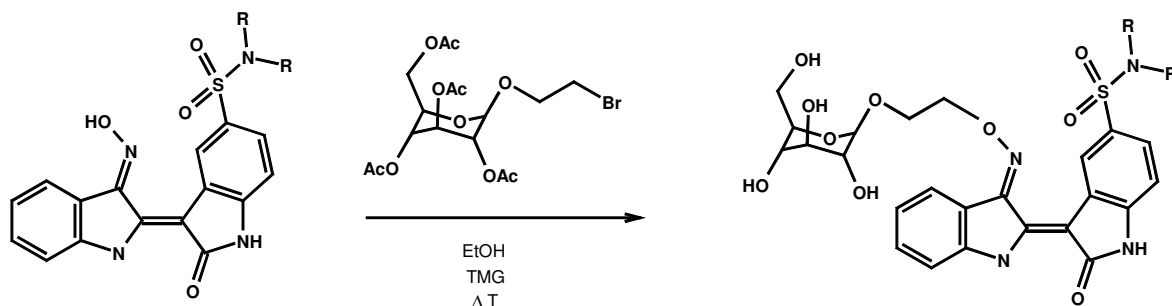


Abbildung 7-13: Kondensation der Indirubin-3'-oxim-Derivate mit bromoethyl-verknüpfter Glucose

Tabelle 7-6: Synthese-Ausbeuten der glucosidischen Indirubin-3'-oxim-Derivaten

Substanz	Ausbeute
5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyl-oxyethyl)-oximether (E808)	46 %
5-(Pyrrolidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyl-oxyethyl)-oximether (E811)	42%

7.2.6. Synthese des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids (E807)

Die Synthese des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids erfolgte durch die Kondensation von Indoxylacetat mit Isatin-5-glucosid. Die Vorstufe des Letzteren war das 5-Hydroxy-isatin, welches nicht käuflich erwerblich war und daher synthetisiert werden musste. Zahlreiche in Position 5 durch Alkylreste substituierte Isatine wurden bereits von Thommet dargestellt [Thommet, 2002]. Das dabei verwendete Verfahren nach Marvel und Hiers [1941], bei dem 4-Alkyl-aniline mit Chloralhydrat und Hydroxylaminhydrochlorid in Gegenwart von wasserfreiem Natriumsulfat zum entsprechenden *N*-(4-Alkyl-phenyl)-2-hydroxyiminoacetamid kondensiert wurden, und anschließend in Gegenwart von konz. Schwefelsäure ein Ringschluss zum Isatin stattfand, erwies sich für das Einführen einer Hydroxy-Gruppe als nicht gangbar, weshalb ein anderer Weg gewählt wurde. Edukt war dabei 4-Hydroxy-anilin, welches an der Amino-Gruppe mit einer BOC-, und an der Hydroxy-Gruppe mit einer TIPS-

Schutzgruppe versehen war. Dieses wurde mit $t\text{BuLi}$ behandelt. Bei der dabei stattfindenden DOM-Reaktion wird das in der ortho-Position zu dem Amino-Stickstoff stehende Proton durch Lithium ersetzt. Die BOC-Schutzgruppe hat dabei einen dirigierenden Effekt auf die Lithiierung, da der Carbonyl-Sauerstoff den Lithium-Komplex stabilisiert [Sniekus (1990), Stanetti et al (1992)]. Nach Zugabe von Diethyloxalat kommt es zu einem nucleophilen Angriff des negativierten, ortho-ständigen aromatischen Kohlenstoff-Atoms auf ein Carbonyl-Kohlenstoff des Oxalats. Nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Erhitzen in ethanolischer HCl findet der Ringschluss durch nucleophilen Angriff der nun freien Aminogruppe auf die Carbonylgruppe des Oxalat-Restes statt (Abbildung 7-14).

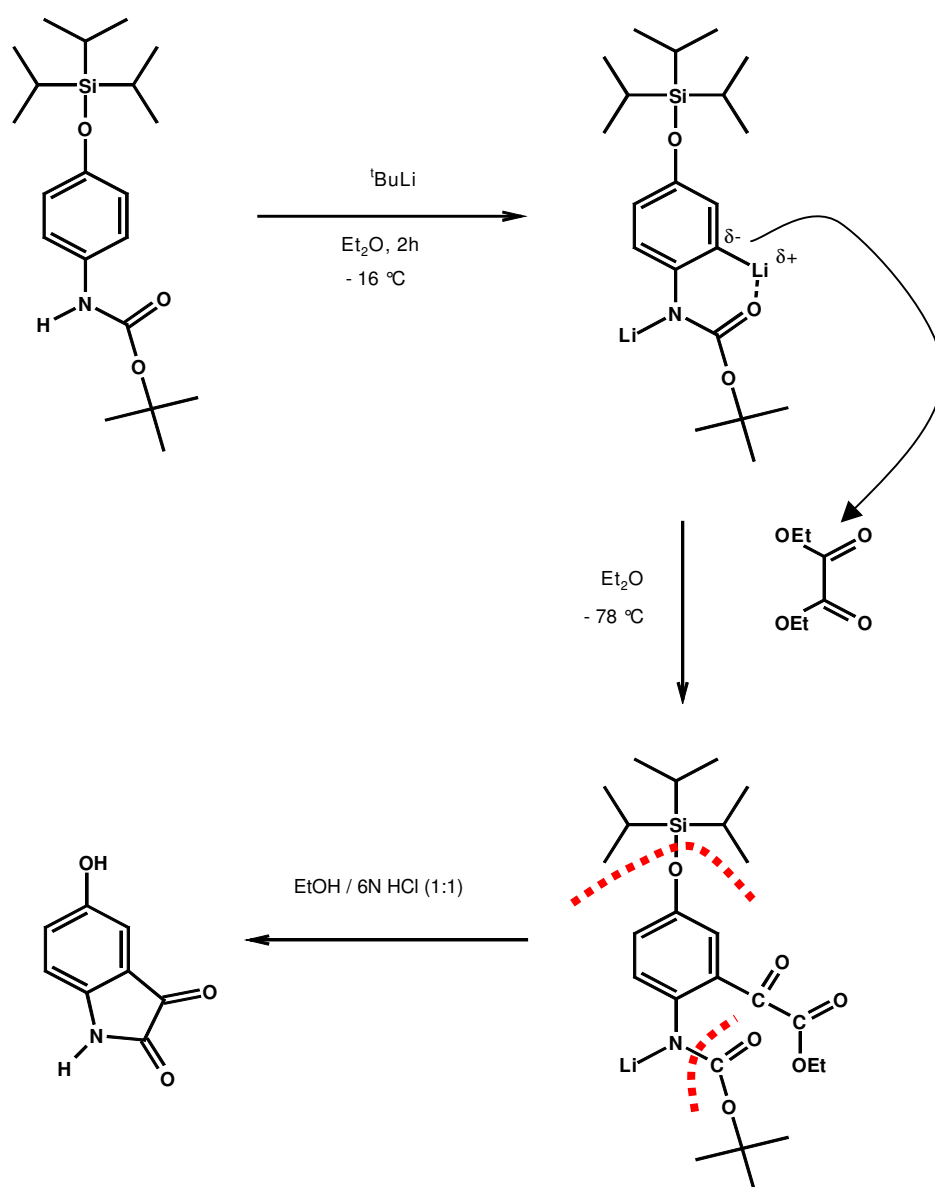


Abbildung 7-14: Synthese von 5-Hydroxy-isatin

Das Isatin-5- β -D-glucopyranosid wurde durch die Verknüpfung von 5-Hydroxy-isatin und α -D-Tetra-O-aceto-fluor-glucose dargestellt. Nach einer Synthesevorschrift von Yamaguchi wurden die beiden Reaktanden in CH_2Cl_2 mit TMG und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ versetzt [Yamaguchi, 1990] (Abbildung 7-15).

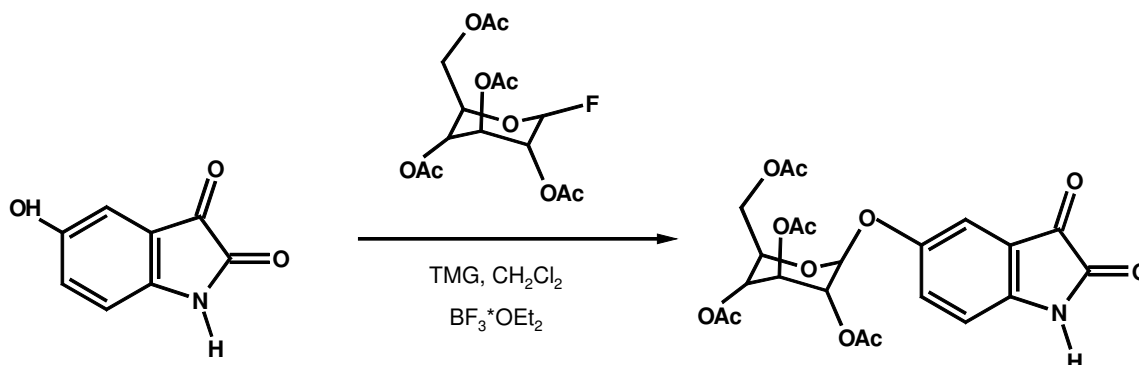


Abbildung 7-15: Glucosidierung von 5-Hydroxy-isatin mittels peracetylierter Fluoroglucose

Dabei dient $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ zur Aktivierung des C1-Kohlenstoff des Zuckers, während TMG das Anomerengleichgewicht der entstehenden Produkte auf die Seite des β -Anomers drängt. Durch Arretierung der C2-Acetyl-Gruppe des Zuckers nach Entfernung des Fluorid-ions mittels BF_3 , greift das Hydroxy-isatin in der β -Position an C1 an. Der dabei entstehende Komplex kann an C1 nun zwischen α - und β -Stellung konvertieren. In Gegenwart von TMG wird das phenolische Proton jedoch direkt abgefangen, und das Phenol bleibt in der β -Position (grün unterlegt in Abbildung 7-17). Die Ausbeute betrug 38,8%, wobei der Anteil des β -Anomeren bei über 90 % liegt.

Das entstandene Isatin-5- β -D-glucopyranosid wird dann nach der Methode von Russell und Kaupp (1969) mit Indoxylacetat in methanolischer Na_2CO_3 -Lösung zum Indirubin-5- β -D-glucosid umgesetzt (Abbildung 7-16). Die Ausbeute betrug 70,8%

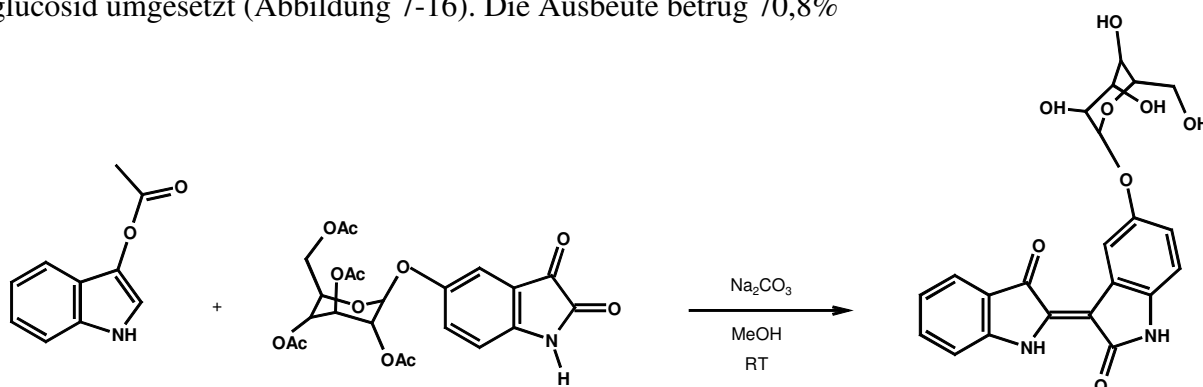


Abbildung 7-16: Darstellung des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids

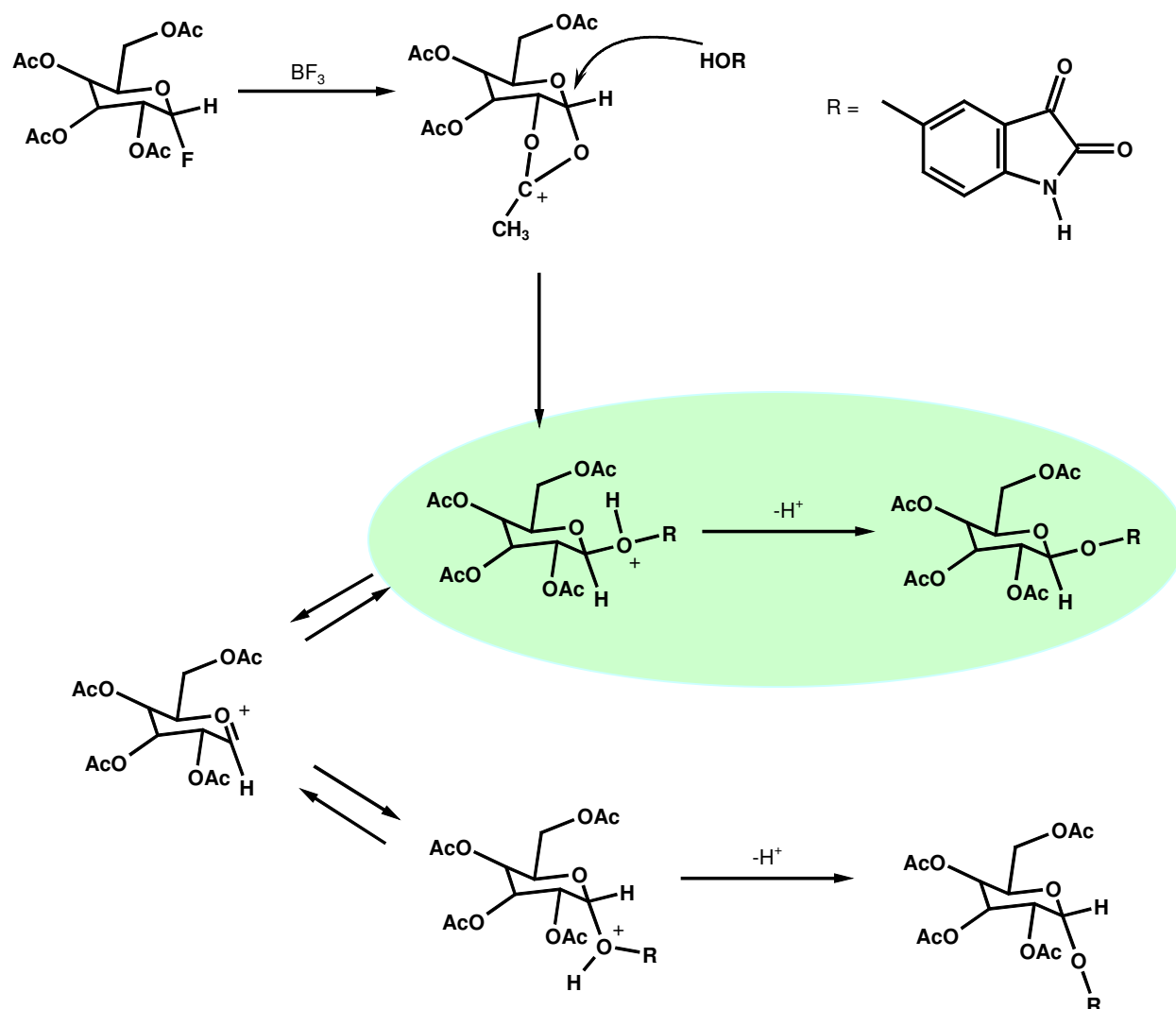


Abbildung 7-17: Reaktionsmechanismus zur Bildung des Isatin-5-β-D-glucopyranosids: Da eine Base wie TMG das phenolische Proton schnell aufnimmt, wird das Anomeren-gleichgewicht in Richtung des β-Anomer verschoben (grün unterlegt).

7.2.7. Synthese von 5-Carboxy-indirubin (E810)

Die Carboxy-Gruppe an Position 5 des Indirubins bietet ähnlich der Sulfonat-Gruppe des E226 die Möglichkeit, neue Amide und Carbonsäureester herzustellen. Die aromatische Carbonsäure liegt im neutralem pH-Bereich teilweise dissoziiert vor. Somit könnte 5-Carboxy-Indirubin –verglichen mit dem vollständig dissoziierten Indirubin-5-sulfonat E226 – eine ähnlich gute Hemmwirkung an der isolierten CDK2 aufweisen, jedoch besser in die Tumorzelle aufgenommen werden. E226 zeigte wegen schlechter Zellpermeabilität an Tumorzellen keine cytotoxischen oder wachstumshemmenden Eigenschaften.

Die Synthese des 5-Carboxy-indirubin wurde nach der Methode von Russell und Kaupp (1969) durchgeführt. Das verwendete 5-Carboxy-isatin war im Arbeitskreis vorhanden.

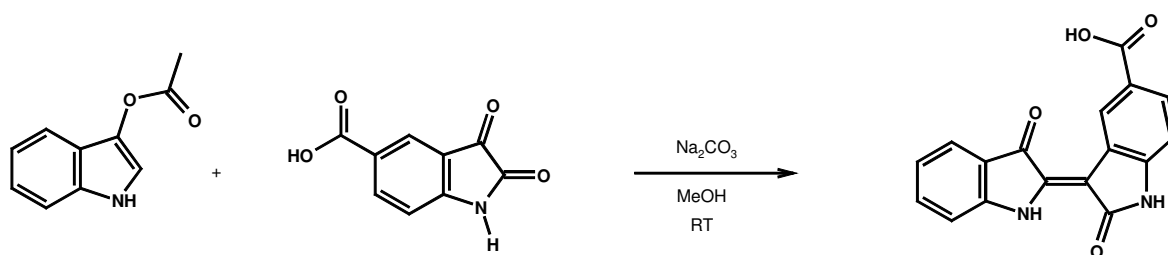


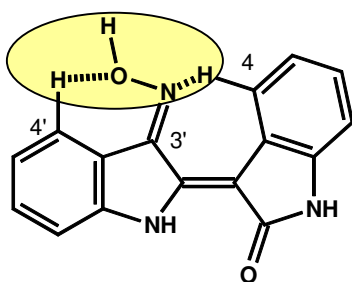
Abbildung 7-18: Darstellung von 5-Carboxy-isatin

Die Ausbeute der Kopplung betrug 76% und ist mit der Ausbeute an Indirubin-5-sulfonat (73%) vergleichbar.

7.2.8. Diskussion ausgewählter NMR-Spektren

Zahlreiche Indirubin-Derivate wurden bereits anhand ihrer NMR-Spektren charakterisiert [Hössel (1999a), Thommet (2001), Schwahn (2004)]. Mit Hilfe dieser Daten und durch Inkrementberechnung wurden in der vorliegenden Arbeit die Signale den entsprechenden Kernen zugeordnet. Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass sich die Lage der Signale der Protonen im NMR-Spektrum von Indirubin und Indirubin-3'-oxim nur in geringem Ausmaß unterscheiden. Lediglich der Unterschied in der Signallage der Protonen an C4 und C4' ist von deutlicherem Ausmaß. Letzteres ist im Spektrum des Indirubin-3'-oxims weiter ins Tieffeld verschoben (ca. 8.24 ppm anstelle von ca. 7.65 ppm beim Indirubin), was auf dem Anisotropieeffekt des Oxim-Sauerstoffatoms beruht, der sich nahe am C4'-Proton befindet. Beim Indirubin bewirkt der Anisotropieeffekt des Carbonyl-Sauerstoffatoms an 3'-Position den starken Tieffeldshift des Signals des H4 (ca. 8,76 ppm). Beim Indirubin-3'-oxim ist dieser Effekt deutlich abgeschwächt (ca. 8.65 ppm), da an der Stelle des Carbonylsauerstoffatoms nun ein Stickstoffatom positioniert ist [Hoessel (1999a)]. Abbildung 7-19 veranschaulicht diesen Sachverhalt.

Indirubin-3'-oxim



Indirubin

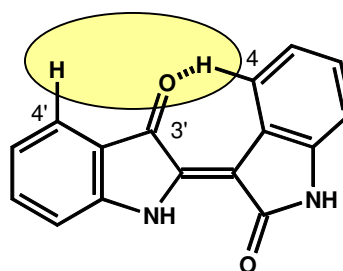


Abbildung 7-19: Einfluss des Substituenten an C3' auf die Protonen an C4 und C4'

Es sollen in diesem Kapitel nur die Spektren einiger ausgewählter Verbindungen diskutiert werden. Die tabellarische Zusammenfassung der NMR-Daten aller dargestellten Verbindungen befindet sich im Kapitel 9 „Experimenteller Teil“.

7.2.8.1. Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether (E803)

Abbildung 7-20 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximethers. Die Singulets bei 11,68 und 10,74 stammen von den Protonen des Stickstoffs N1' und dem Lactam-Stickstoff N1. Die Protonen an C4 und C4' treten bei 8,61 ppm und 8,11 ppm in Resonanz, während die restlichen aromatischen Protonen zwischen 6,7 ppm und 7,5 ppm in Resonanz treten und sich teilweise überlagern (Abb. 7-21 unten).

Wie in Abbildung 7-21 oben zu erkennen, treten die Protonen des Hydroxybutyl-Restes in dem Bereich zwischen 1,5 und 4,7 ppm in Resonanz, wobei das Triplet bei 4,50 ppm der Hydroxy-Gruppe, das Triplet bei 4,61 ppm der Methylen-Gruppe A direkt am Oxim-Sauerstoff, und das Quartett bei 3,48 ppm der Methylen-Gruppe D zugeordnet wird. Die beiden mittleren Methylen-Gruppen B und C treten mit je einem Quintett bei 1,93 und 1,62 ppm in Resonanz.

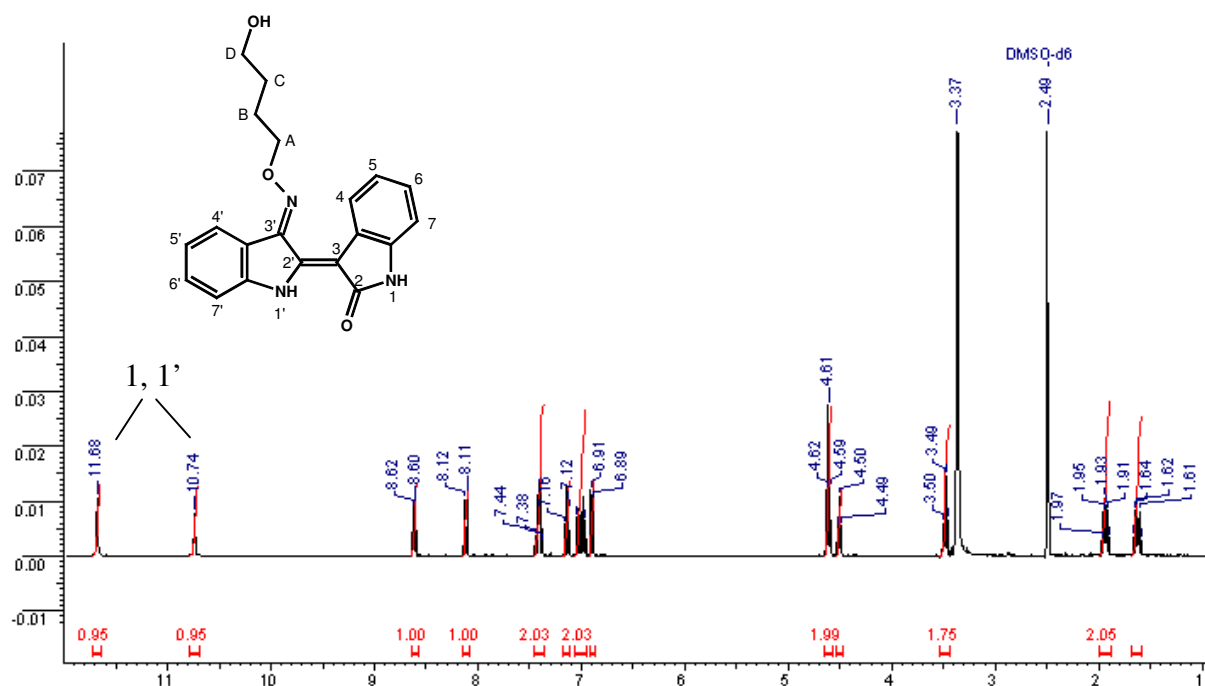
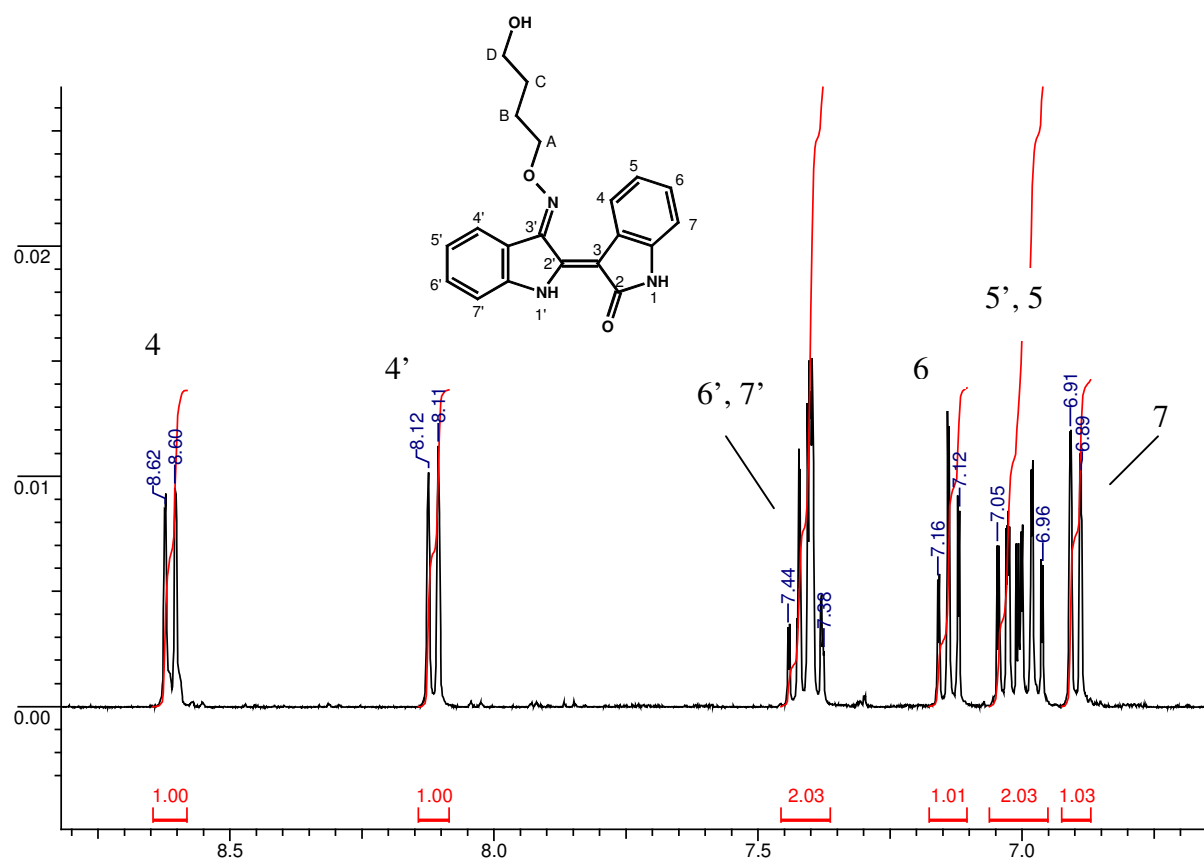
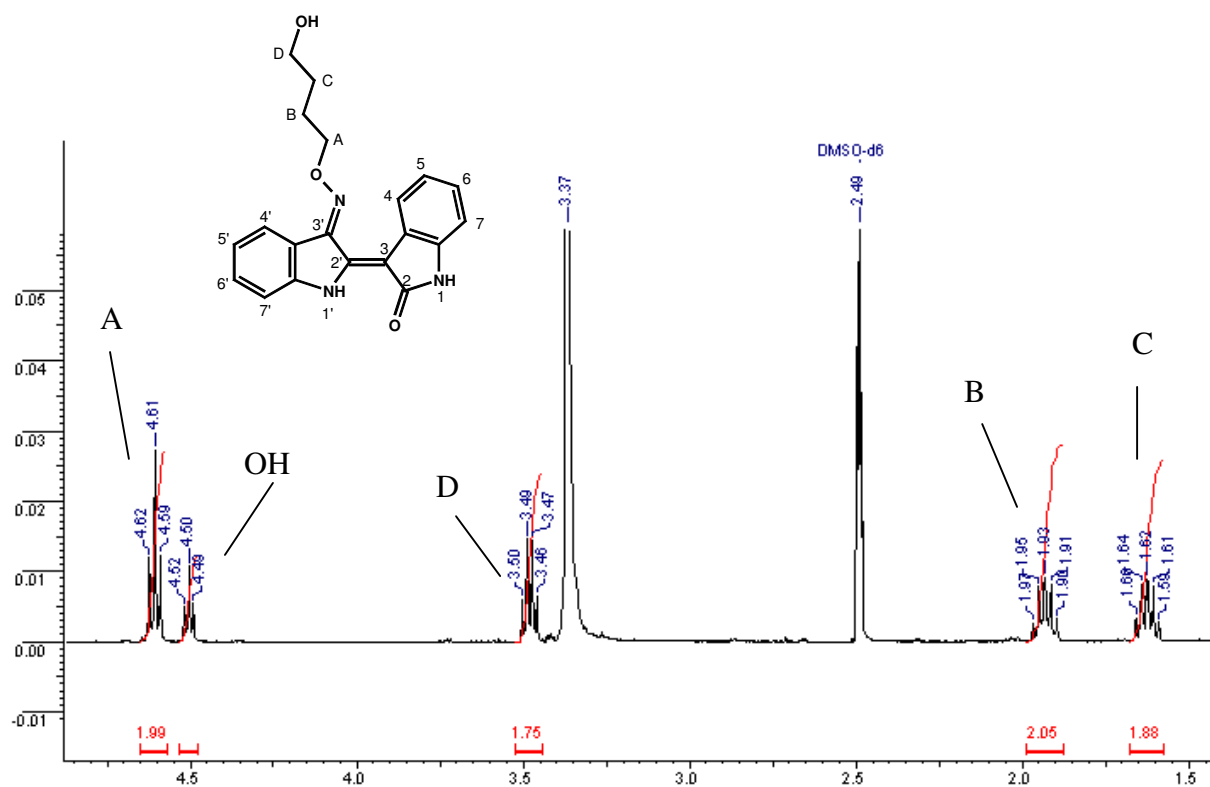
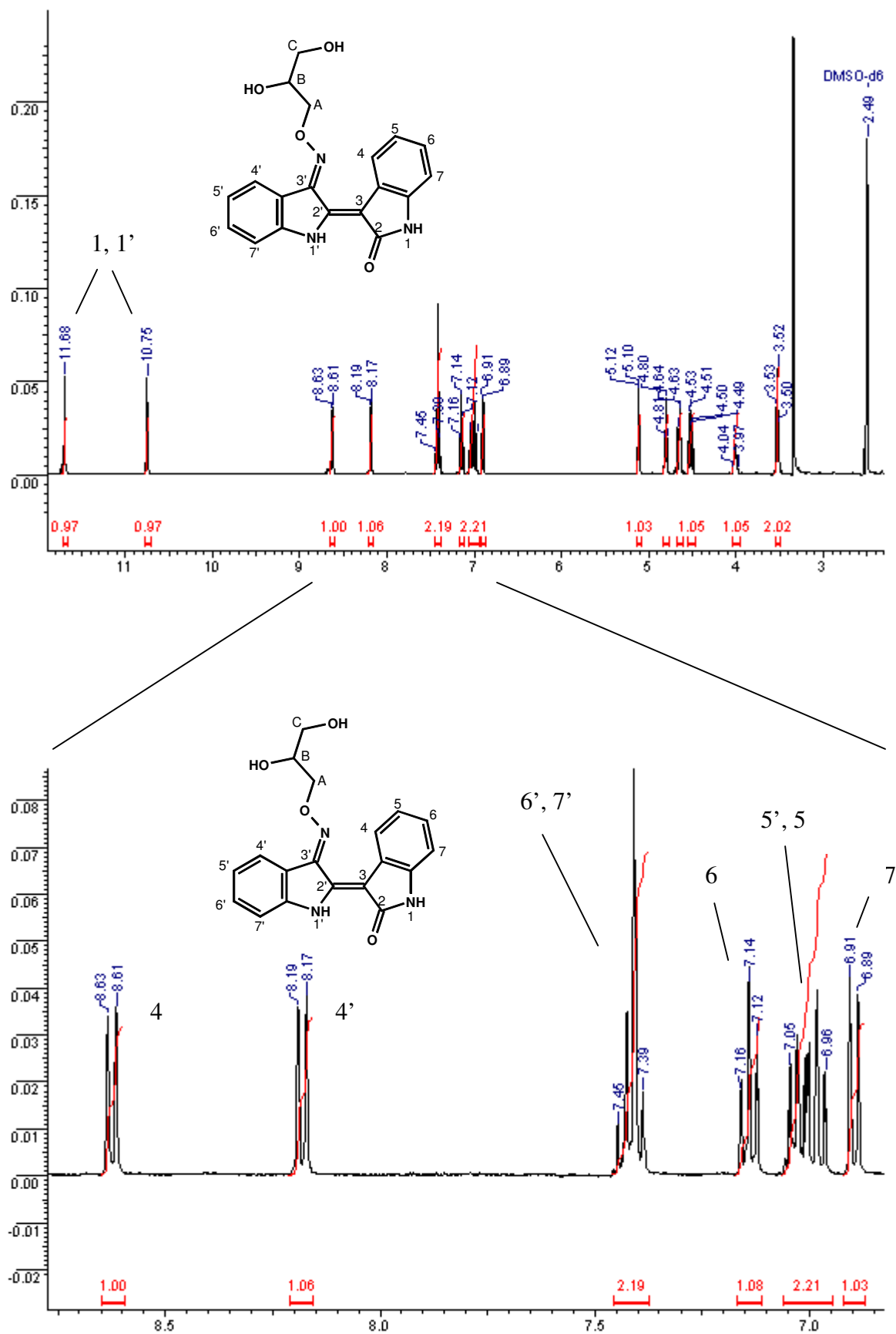


Abbildung 7-20: ^1H -NMR-Spektrum von E803

Abbildung 7-21: Vergrößerte Teilausschnitte des ¹H-NMR-Spektrums von E803

7.2.8.2. Indirubin-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether (E804)

Abbildung 7-22: Oben: ^1H -NMR-Spektrum von E804; unten: : gezoomter Bereich von 6,5 ppm – 8,6 ppm

Ein Vergleich der Spektren von E803 und E804 zeigt, dass die beiden Substituenten praktisch keinen Einfluss auf die restlichen Protonen des Moleküls haben (Bereich 6,5 bis 12,00 ppm). Sowohl die Stickstoff-Protonen an N1 und N1' als auch die aromatischen Protonen treten bei annähernd gleichem Feld in Resonanz. Die Spektren unterscheiden sich daher lediglich im Kopplungsmuster der Substituenten selbst.

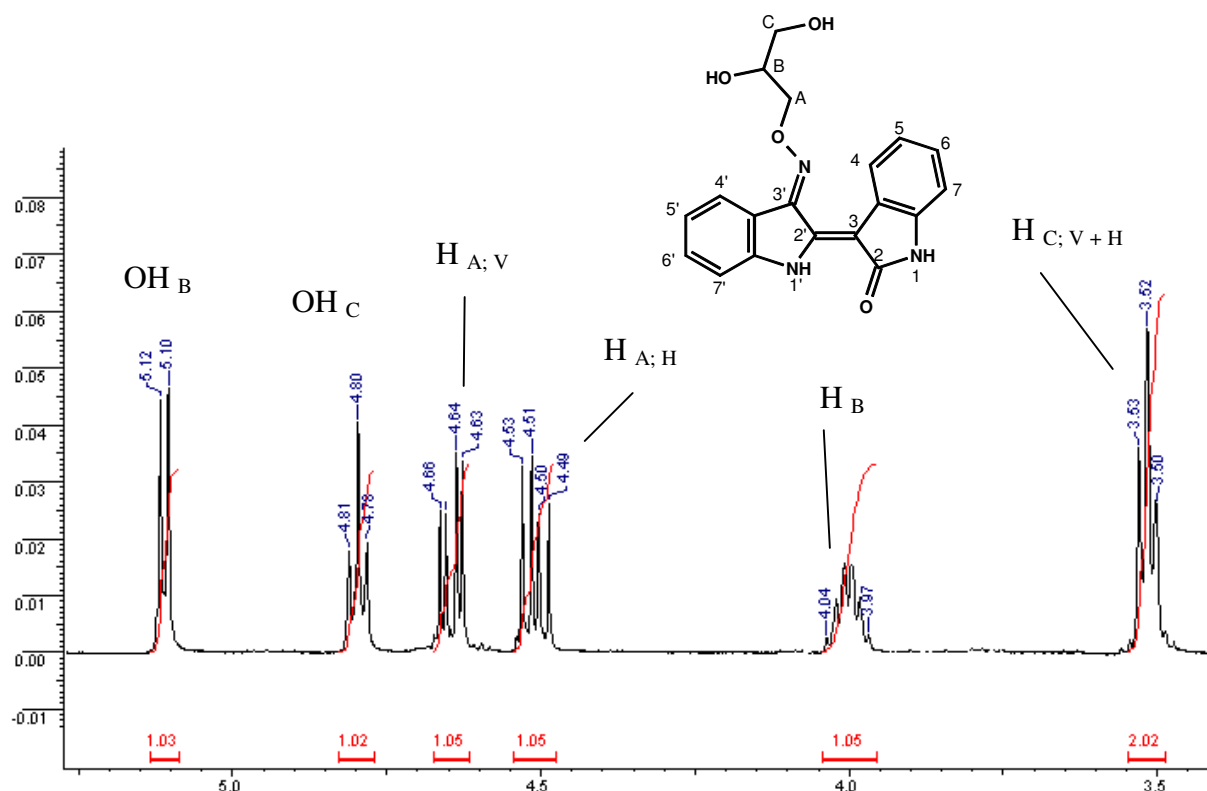


Abbildung 7-23: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von E804; „H“ = Proton hinter der Blattebene, „V“ = Proton vor der Blattebene

Dabei treten die Hydroxy-Gruppen an „B“ und „C“ als Dublett bei 5,11 ppm und als Triplet bei 4,80 ppm in Resonanz. Das Proton an B bildet mit den diastereotopen Protonen an A und C jeweils ein ABM-System. Daher treten H_{A,V} und H_{A,H} jeweils als Doppeldublet bei 4,64 ppm und 5,50 in Resonanz. H_{C,V} und H_{C,H} treten als Pseudotriplett bei 3,52 ppm in Resonanz, während das Signal des H_B als Multiplett bei 4,00 ppm in Erscheinung tritt.

7.2.8.3. 3'-[(2-Hydroxyethyl) aminocarbonyl methyl-oxyimino-] indirubin (E805)

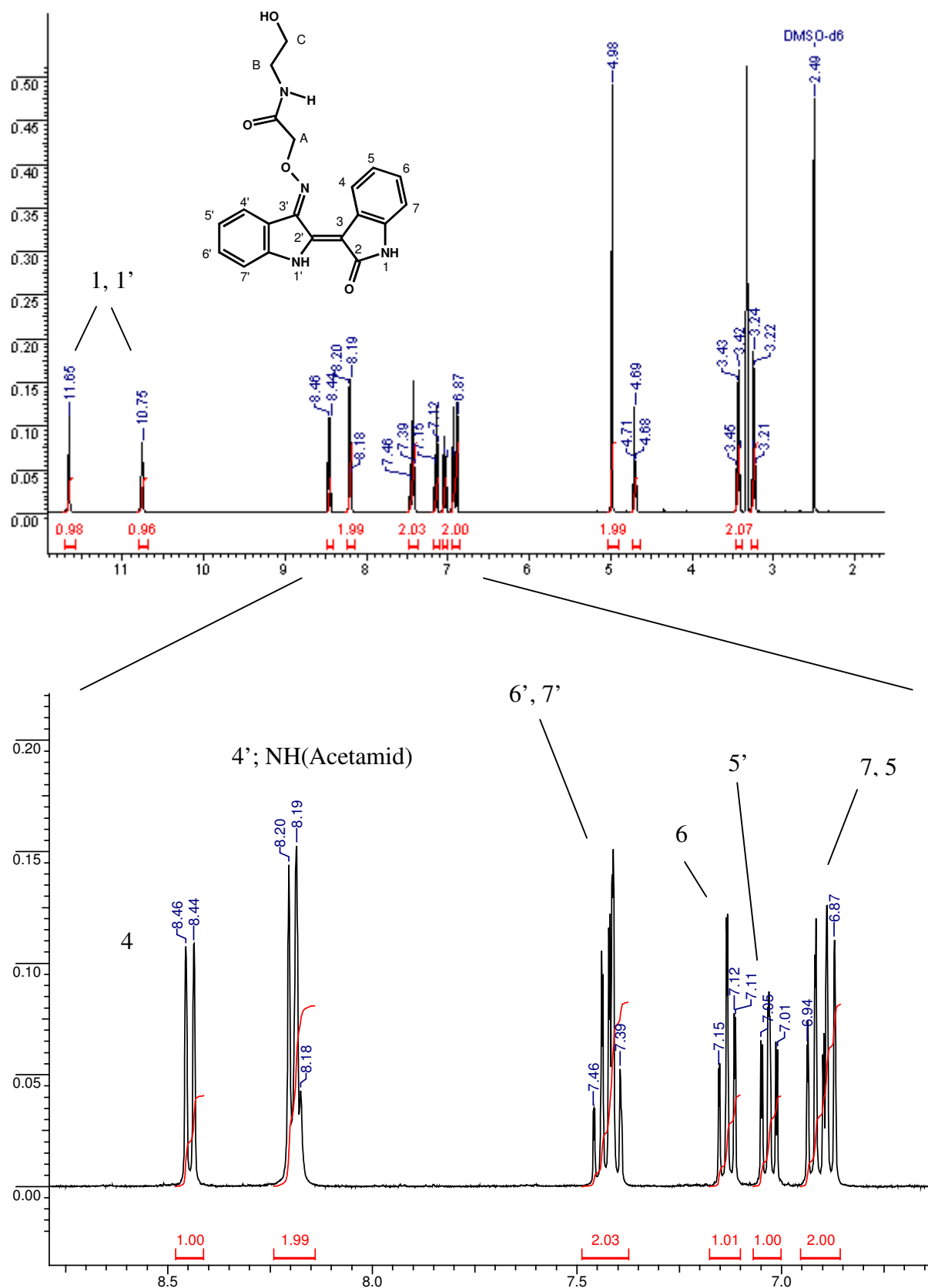


Abbildung 7-24: Oben: ^1H -NMR-Spektrum von E805; unten: gezoomter Bereich von 6,5 ppm – 8,6 ppm

Auch der Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von E805 mit den ^1H -NMR-Spektren von E803 und E804 zeigt wiederum, dass der Oximether-Substituent an der 3'-Position nahezu keinen Einfluss auf die restlichen Protonen des Moleküls hat (Bereich 6,5 bis 12,00 ppm; Abbildung 7-24). Sowohl die Stickstoff-Protonen an N1 und N1' als auch die aromatischen Protonen treten bei annähernd gleichem Feld in Resonanz. Unter dem Signal des 4'-Protons liegt allerdings das Signal des amidischen NH des Substituenten, welches bei 8,18 ppm in Erscheinung tritt. Die Spektren unterscheiden sich lediglich im Kopplungsmuster der Substituenten selbst. So erscheint das Signal der Methylengruppe „A“ als Singulett bei 4,98 ppm, während die Signale der beiden Methylengruppen „B“ und „C“ bei höherem Feld in den Bereichen 3,21 – 3,25 ppm und 3,40 – 3,45 ppm jeweils als Pseudo-Quartett erscheinen. Die OH-Gruppe an „C“ tritt als Triplett bei 4,69 ppm in Erscheinung.

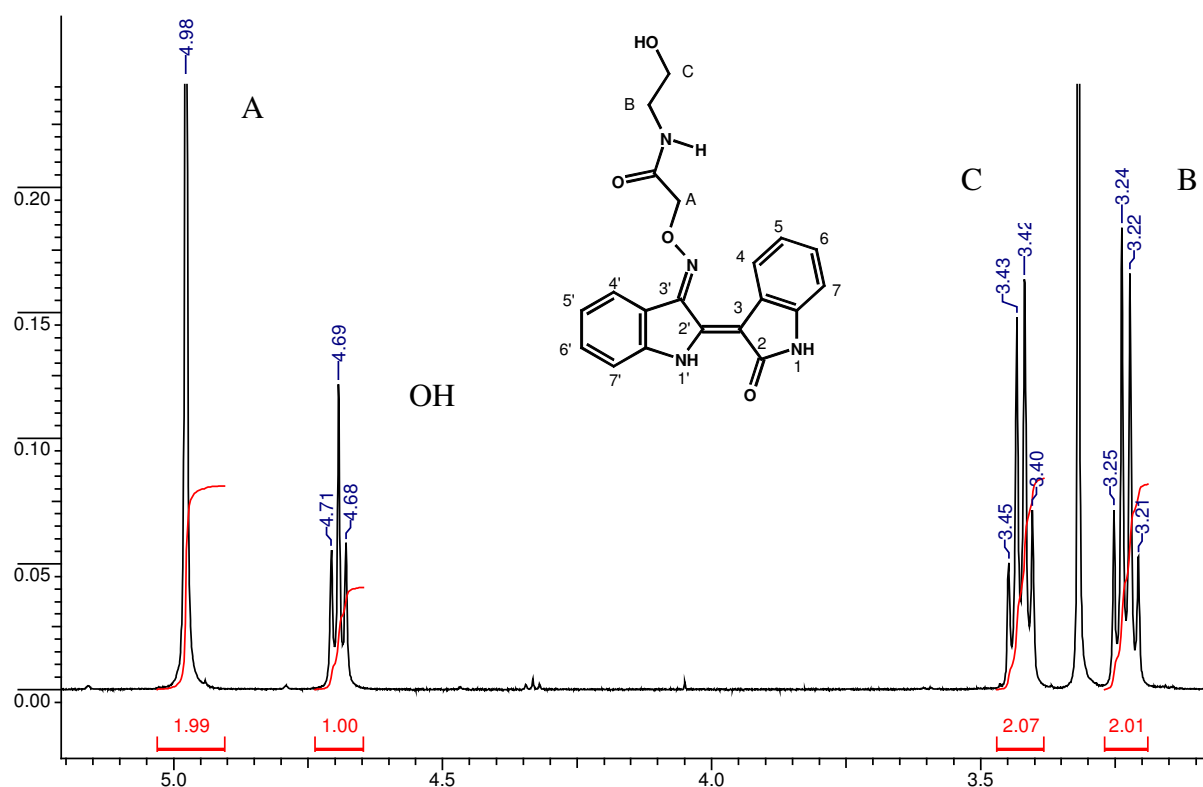


Abbildung 7-25: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von E805 von 3,0 bis 5,5 ppm

7.2.8.4. 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl)indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether (E811)

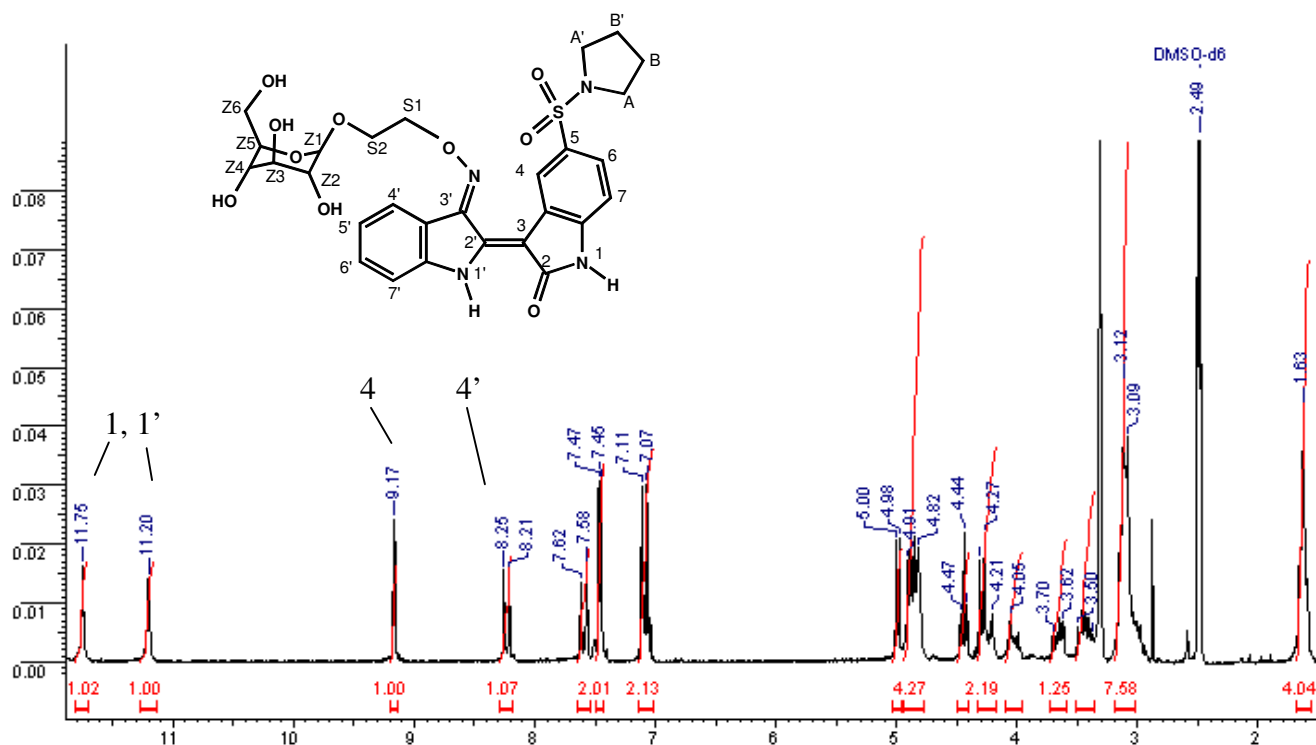


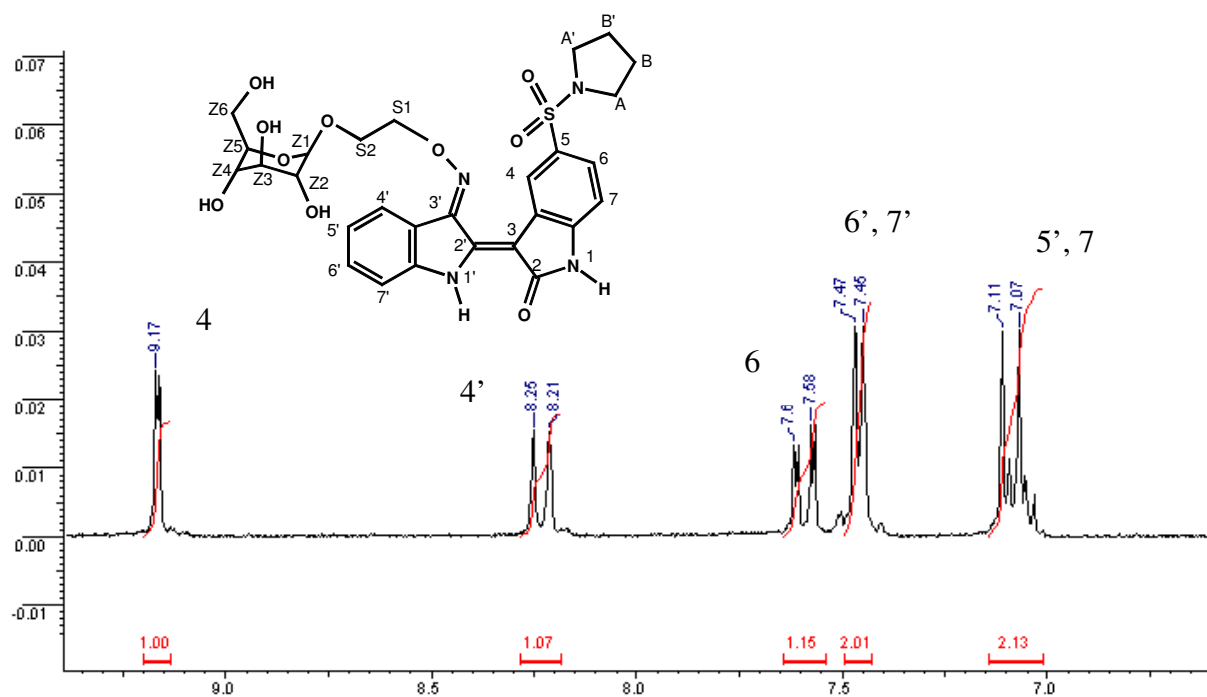
Abbildung 7-26: ¹H-NMR-Spektrum von E811

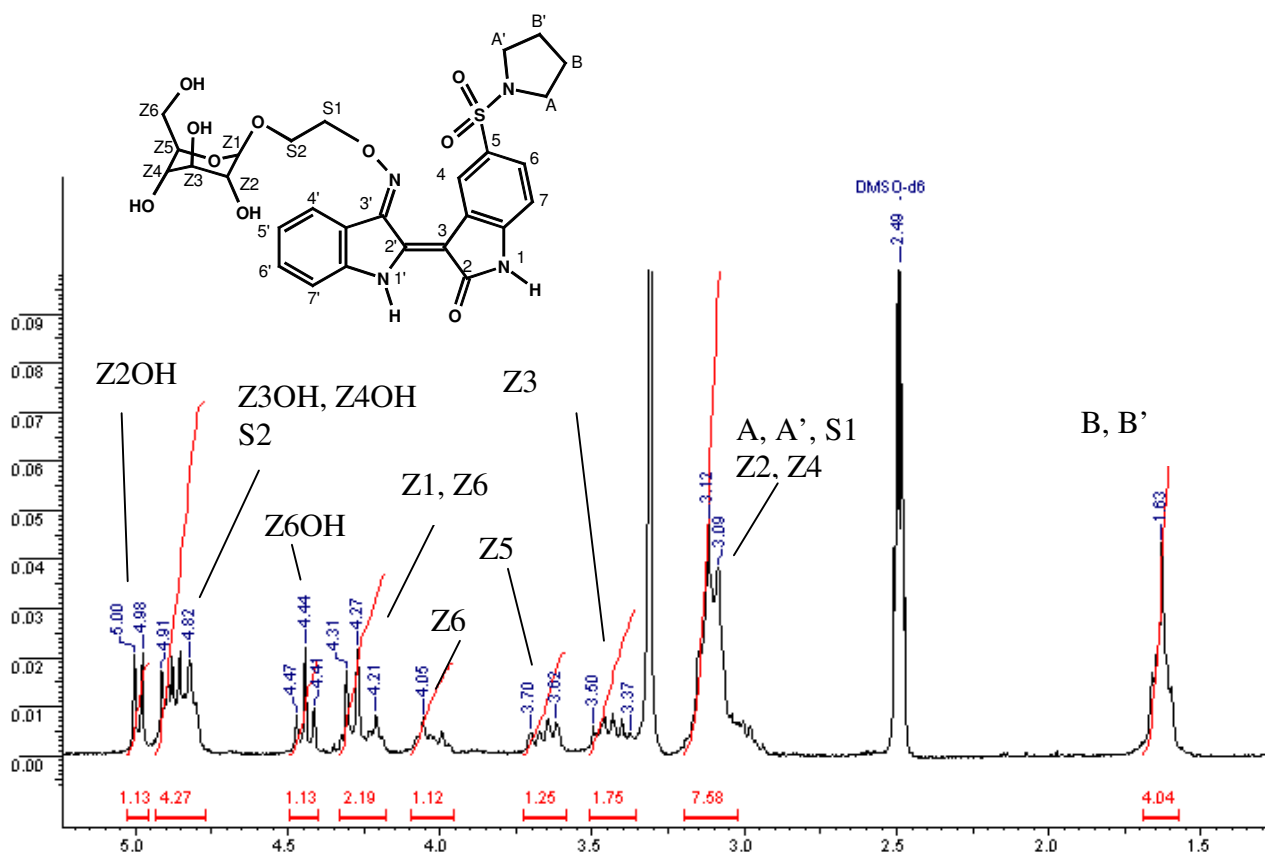
Auffällig am ¹H-Spektrum von E811 ist die starke Tieffeldverschiebung des C4-Protonen-Signals (Abbildungen 7-26 und 7-27). Dies ist auf den Einfluss der Sulfonamidgruppe zurückzuführen, welche im aromatischen Ring eine Tieffeldverschiebung des Signals des orthoständigen Protons bewirkt. Die Signale der restlichen Protonen des Indirubingerüsts erscheinen im Bereich von 6,5 bis 12,00 ppm bei vergleichbarem Feld wie die Signale der bisher besprochenen Moleküle, wobei das Kopplungsmuster aufgrund der Substitution des Protons an C5 variiert. Die Signale im Bereich zwischen 3 und 5 ppm sind den Protonen der Zucker+Spacer-Einheit zuzuordnen, wobei in dem Bereich um 3,10 ppm auch die vier „A“-Protonen des Pyrrolidins in Resonanz treten. Das Signal der 4 restlichen Protonen des Pyrrolidins erscheint bei 1,63 ppm (Abbildung 7-28).

Tabelle 7-7 veranschaulicht die Tieffeldverschiebung des Signals des C4-Protons durch eine Sulfonsäure- bzw. Sulfonamidgruppe in 5-Position. Der Ersatz der Sulfonamidgruppe durch eine Carboxygruppe führt zu einem noch stärkeren Tieffeld-Shift.

Tabelle 7-7: Chemische Verschiebung [ppm] des Protons an Position 4 verschiedener Indirubin-Derivate

Verbindung	C4-H [ppm]
Indirubin (E211)	8,76
Indirubin-5-sulfonat (E226)	9,13
5-Piperidino-sulf.-indirubin (E800)	9,17
5-Pyrrolidino-sulf.-indirubin (E801)	9,25
Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether (E671)	8,59
5-Pyrrolidino-sulfonyl-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether (E811)	9,17
Indirubin-5- β -D-glucopyranosid (E807)	8,56
Indirubin-5-carbonsäure (E810)	9,42

**Abbildung 7-27: Bereich von 6,5 bis 9,3 ppm des ^1H -NMR-Spektrums von E811**

Abbildung 7-28: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von E811

7.2.8.5. Isatin-5 -(*tetra-O-acetyl*)- β -D glucopyranosid (E807)

Das Signal des amidischen Protons tritt im tiefen Feld bei 10,93 ppm in Erscheinung. In Abbildung 7-29 ist das für 1,2,4 - substituierte Phenylringe charakteristische Signalmuster zu erkennen, das aus zwei Dubletts und einem Doppeldublett besteht, wobei Letzteres beim Isatin dem Proton an C6 zuzuordnen ist, welches sowohl mit dem Proton an C7, als auch über eine ^4J -Kopplung mit dem Proton an C4 koppelt.

Im hohen Feld zwischen 2,0 und 6,0 ppm treten die Protonen der acetylierten Glucose in Resonanz, wobei die Signale der 4 Acetylgruppen jeweils als Singulett in dem Bereich um 2,0 ppm erscheinen. An dem Dublett bei 5,70 ppm ist außerdem zu erkennen, dass etwa 10% des Zuckers als α -Anomer vorliegt: Dies ist das Signal des anomeren C-Atoms der α -Glucose, während das Dublett bei 5,48 ppm das Signal des anomeren C-Atoms der β -Glucose ist. Die Zuordnung zu dem jeweiligen Anomer erfolgt anhand der Kopplungskonstanten, welche für zwei axial-gegenständige Protonen größer ist als die für axial-equatorial-ständige Protonen (siehe Abbildung 7-30).

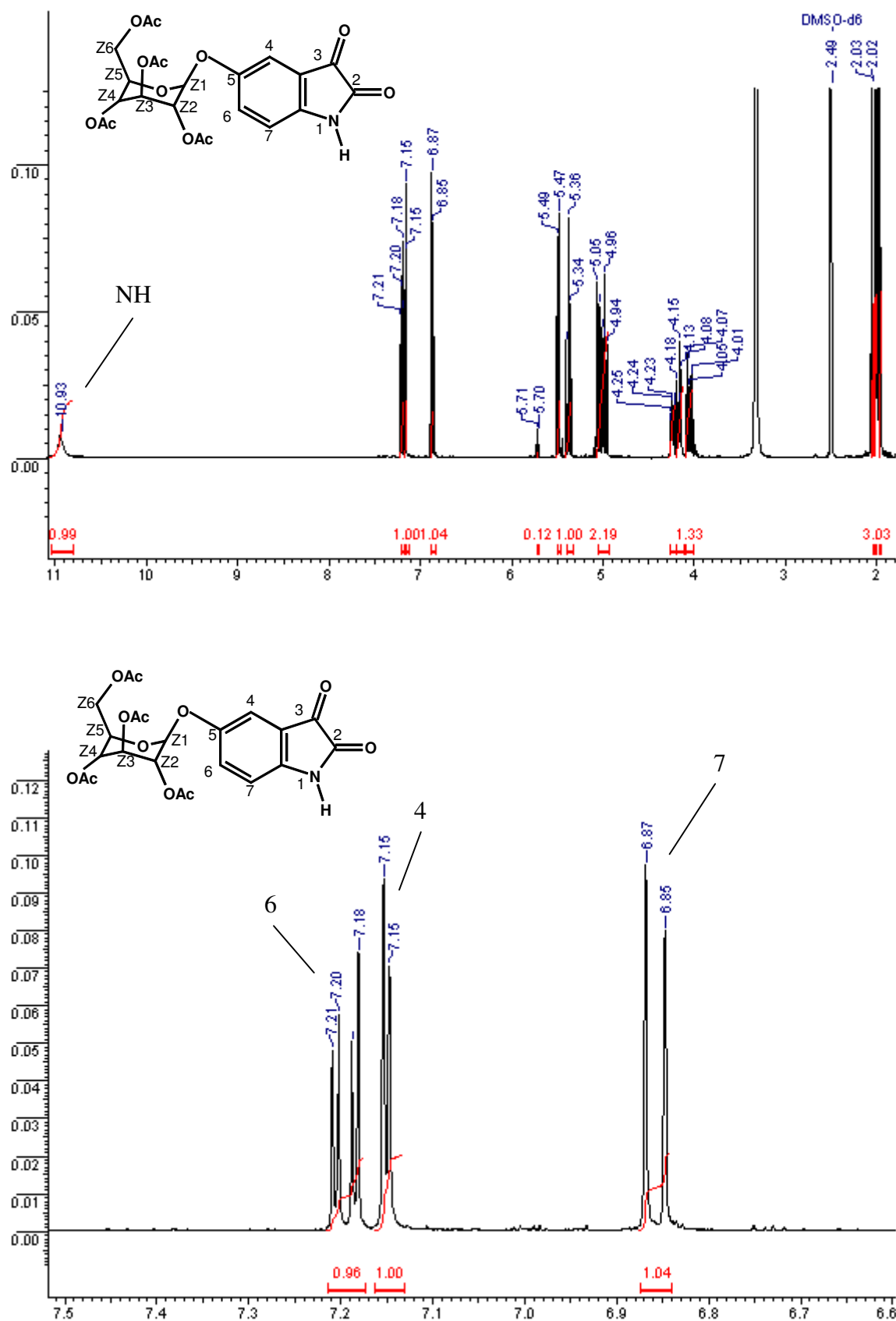
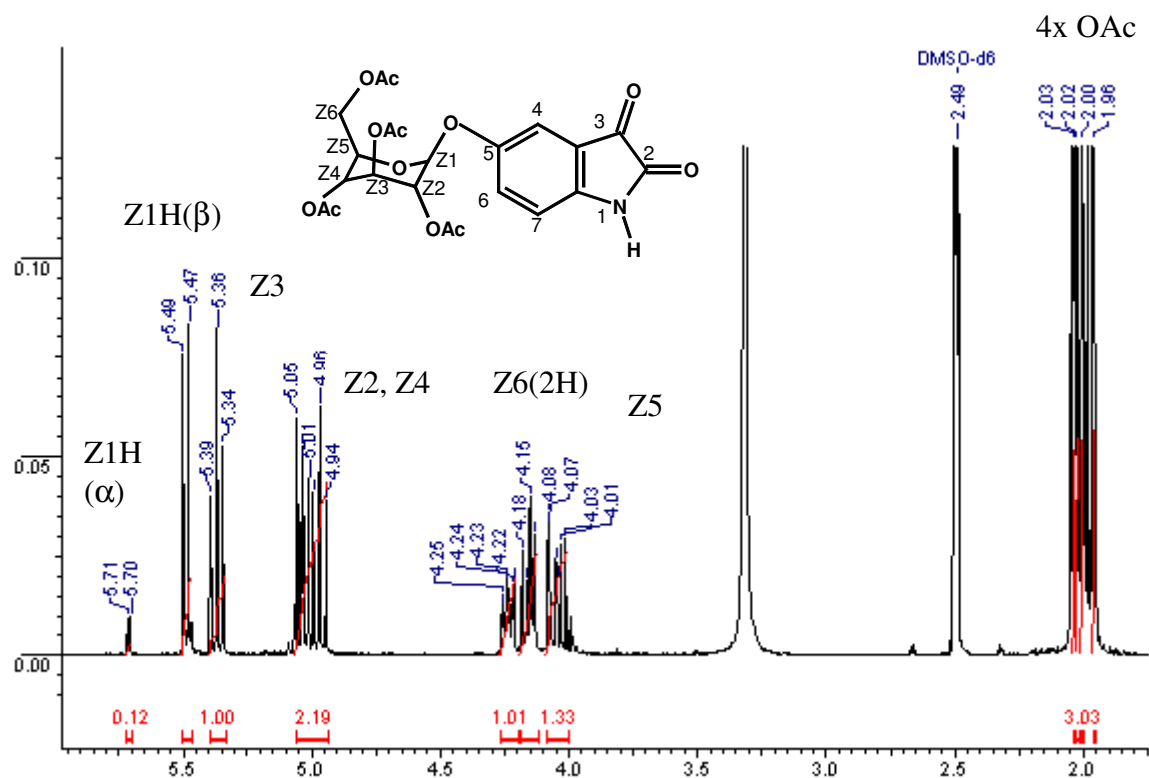


Abbildung 7-29: Oben: ^1H -NMR-Spektrum von Isatin-5-glucosid; unten: Zoomansicht des Bereiches von 6,6 bis 7,5 ppm

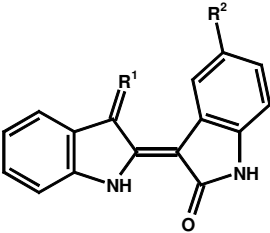
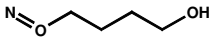
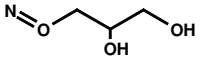
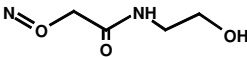
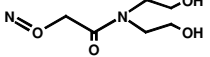
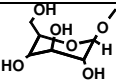
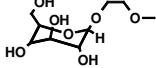
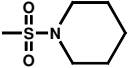

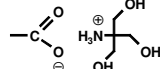
Abbildung 7-30: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Isatin-5-glucosid

7.3. Ergebnisse der biochemischen Analytik

7.3.1. CDK2/CyclinE – Assay

Die inhibitorische Wirkung der synthetisierten Verbindungen auf den CDK2/CycE – Komplex wurde mittels CDK2 - Filter Assay bestimmt. Bei diesem Assay wird das isolierte Enzym mit der zu testenden Substanz, radioaktiv markiertem ATP (γ - ^{32}P – ATP) und dem entsprechenden Substrat, einem Histon H1 Protein, inkubiert. Das entsprechend der Enzymaktivität phosphorylierte und ^{32}P -markierte Substrat wird anschließend auf Phospho-Cellulose Sheets immobilisiert und im Szintillationszähler auf Strahlungsaktivität untersucht. Tabelle 7-8 fasst die Hemmdaten zusammen:

Tabelle 7-8: IC_{50} -Werte der Indirubin-Derivate für die Hemmung am CDK2/CycE-Komplex

Substanz			IC_{50} an CDK2/CycE [μM]
	R1	R2	
E803		H	$3,32 \pm 0,54$
E804		H	$0,21 \pm 0,04$
E805		H	$0,60 \pm 0,07$
E806		H	$0,87 \pm 0,16$
E807	O		$2,00 \pm 0,33$
E808			$1,78 \pm 0,33$
E810	O		$0,21 \pm 0,02$
E813	O		$0,27 \pm 0,05$

Die stärkste inhibitorische Wirkung auf den CDK2/CycE – Komplex haben E804 ($IC_{50} = 0,21 \mu M$), E810 ($IC_{50} = 0,21 \mu M$) und dessen Tris-Salz E813 ($IC_{50} = 0,27 \mu M$). Ähnlich effektiv zeigte sich bei früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe das Indirubin-5-sulfonat E226 mit einem IC_{50} -Wert von $0,60 \mu M$ [Daten aus der Arbeitsgruppe Eisenbrand]. Aus der Röntgenstrukturanalyse (Kapitel 5 „Kristallstrukturen“) geht hervor, dass die Sulfonatgruppe des Indirubin-5-sulfonats in der Bindungstasche der CDK2 eine Position einnimmt, in der auch die α -Phosphatgruppe des ATP liegt. Ähnlich der Sulfonatgruppe können auch durch die Carboxylatgruppe bei E810 und E813 zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit der Seitenkette von Lys33 stattfinden und so zu der starken Hemmwirkung der Verbindungen beitragen.

Gegenüber dem Dihydroxypropyloximether E804 zeigen die Aminocarbonylmethyloximether E805 und E806 mit $0,60 \mu M$ und $0,87 \mu M$ etwas höhere IC_{50} -Werte, wobei diese offenbar mit der Größe des Substituenten zunehmen. Ein noch größerer Substituent, nämlich eine Glucopyranosylethylgruppe führt bei der Verbindung E671 zu einem noch höheren IC_{50} -Wert von $1,7 \mu M$ [Daten aus der Arbeitsgruppe Eisenbrand].

Jedoch hemmt der 4-Hydroxybutyl-oximether mit einem IC_{50} -Wert von $3,32 \mu M$, was verdeutlicht, dass nicht nur die Größe, sondern auch die Beschaffenheit des Substituenten Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der Indirubin-oximether-Derivate hat. Eine verhältnismäßig hydrophobe Gruppe wie der n-Butanol-Rest scheint weniger geeignet für die Bindung in der ATP-Bindungstasche des CDK2/CycE-Komplexes. In dieser Region der Bindungstasche befindet sich bei ATP-Bindung die Ribose-Einheit, so dass also eine eher hydrophile Gruppe (z.B. der Propandiol-Rest von E804) offenbar favorisiert wird.

Für das 5-Piperidinosulfonyl-indirubin E808 wurde ein IC_{50} -Wert von $1,78 \mu M$ gemessen. Ein Vergleich mit der korrespondierenden Verbindung E671 ohne Sulfonamidgruppe in Position 5 zeigt, dass diese Gruppe nicht zu einer stärkeren Enzymhemmung führt (IC_{50} E671: $1,7 \mu M$).

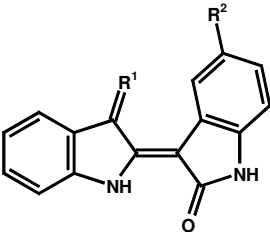
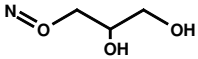
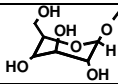
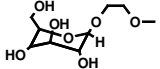
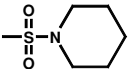

Auch das β -D-Glucosid E807, mit dem Zuckersubstituenten in Position 5 zeigt mit einem IC_{50} -Wert von $2,00 \mu M$ eine mit E808 und E671 vergleichbare Hemmwirkung. Im Gegensatz zu E671 ist der Zucker bei E807 zwar ohne Spacer direkt an das Indirubin gebunden, die IC_{50} -Werte deuten jedoch darauf hin, dass es offenbar keine große Bedeutung für die inhibitorische Aktivität am Enzym hat, ob sich der Zuckerrest an Position 3' oder an Position 5 des Indirubins befindet.

7.3.2. GSK-3 β -Assay

Der GSK-3 β -Assay wird analog dem CDK2/CycE-Assay durchgeführt. Als Substrat dient hierbei eine Peptidkette der Sequenz RRAAEELDSRAG-pS-PQL, wobei „pS“ für einen phosphorylierten Serin-Rest steht. Diese Sequenz stellt ein von der GSK bevorzugtes Substratmuster dar (siehe Kapitel 4.2).

Tabelle 7-9 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen:

Tabelle 7-9: IC₅₀-Werte für die Hemmung der GSK-3 β

Substanz			IC ₅₀ an GSK-3 β [μ M]
	R1	R2	
E804		H	0,11 \pm 0,02
E807	O		0,76 \pm 0,1
E808			> 5
E810	O		< 0,05

E810 mit der Carboxylatgruppe an Position 5 erweist sich mit einem IC₅₀-Wert < 0,05 μ M als äußerst potenter GSK-3 β Inhibitor. Ein Grund hierfür könnte die Aminosäure Lys85 in der Bindungstasche der GSK-3 β sein. Diese liegt in einer der Aminosäure Lys33 der CDK2 vergleichbaren Position [Polychronopoulos, 2004]. Lys33 geht mit der Sulfonatgruppe von E226 elektrostatische Wechselwirkungen ein, die zur starken Hemmung von E226 an der CDK2 beitragen (siehe Kapitel 5 „Kristallstrukturen“). Analog dazu ist zu vermuten, dass auch die Carboxylatgruppe von E810 mit Lys85 der GSK-3 β eine elektrostatische Wechselwirkung eingeht, welche zu der starken Hemmwirkung beiträgt.

E808 hat mit einem IC₅₀-Wert von > 5 μ M an der GSK-3 β im Gegensatz zur CDK2 eine nur schwache Hemmwirkung. Vergleicht man die IC₅₀-Werte der Verbindungen an den beiden Enzymen untereinander, so hat E808 an der GSK-3 β eine signifikant schwächere Aktivität.

Offenbar verringert die Kombination des Piperidino-sulfonyl-Restes und des Glucopyranosyloxyethyl-Restes die Bindungsfähigkeit von E808 in der Bindungstasche der GSK-3 β .

E807 und E804 mit nur einem Substituenten an Position 5 bzw. 3' erweisen sich hingegen mit IC₅₀-Werten von 0,76 μ M und 0,11 μ M als potente GSK-3 β - Inhibitoren.

7.4. Wasserlöslichkeit

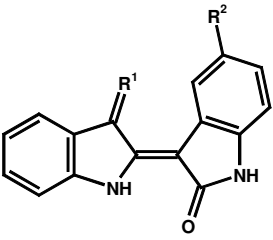
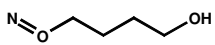
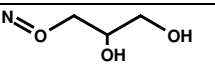
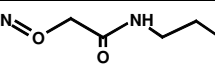
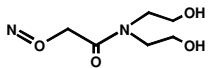
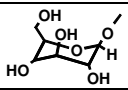
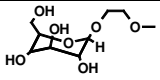
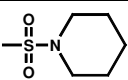

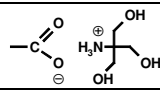
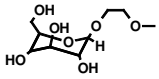
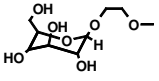

Um für einen therapeutischen Einsatz als Antitumor-Wirkstoff geeignet zu sein, muss für die entwickelten Indirubin-Derivate neben der biologischen Aktivität an den erwähnten Targets auch eine entsprechende Bioverfügbarkeit erreicht werden, so dass sie im Körper an ihren Wirkungsort gelangen können.

Wie in Kapitel 5.3 „Intermolekulare Wasserstoffbrücken“ beschrieben, sind Indirubine i. A. schlecht löslich, und verfügen nur über eine geringe Bioverfügbarkeit.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit besteht in der Erhöhung der Wasserlöslichkeit, was im Rahmen dieser Arbeit durch das Einbringen von Hydroxylgruppenhaltigen Substituenten in das Indirubin-Gerüst erreicht werden sollte.

Die Wasserlöslichkeit der entwickelten Verbindungen wurde UV/VIS – photometrisch bestimmt. Dazu wurde von jeder Verbindung eine gesättigte Lösung in Wasser hergestellt, welche anschließend gegen eine Eichgerade vermessen wurde. Zur Erstellung der Eichgerade wurde eine methanolische Stammlösung der betreffende Verbindung hergestellt, welche dann entsprechend verdünnt wurde. In Tabelle 7-10 sind die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchung zusammengefasst.

Tabelle 7-10: Wasserlöslichkeiten der untersuchten Indirubin-Derivate

Substanz			[mg / l]
	R1	R2	
E803		H	0,1
E804		H	1,9
E805		H	0,5
E806		H	4,0
E807	O		4,7
E808			3,0
E810	O		41 *
E813	O		32,8
E671		H	23 *
E690			5 *

* vorhandene Daten aus dem Arbeitskreis

Aus Tabelle 7-10 wird ersichtlich, dass die dargestellten Indirubin-Derivate trotz hydrophiler Substituenten immer noch schwer wasserlöslich sind. Der Propandiol- sowie die Ethanol- und Diethanolacetamid-Substituenten der Oximether E804 bis E806 führen nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Wasserlöslichkeit, was durch die gemessenen Werte von 1 mg/ml bis 4 mg/l verdeutlicht wird. Die Einführung eines Zuckermoleküls hingegen führt zu einer deutlich höheren Wasserlöslichkeit. Dieser Effekt ist jedoch scheinbar auf die Position 3' beschränkt, was aus den stark differierenden Werten der Verbindungen E671 (23 mg/l) und E807 (4,7 mg/l) ersichtlich wird. Eine zusätzliche Dimethylsulfonamid- (E690) oder

Piperidinosulfonylgruppe (E808) führt wiederum zu einer deutlich verringerten Löslichkeit der Verbindungen.

Die höchste Löslichkeit wird erwartungsgemäß durch das Einfügen einer ionischen Gruppe erreicht, wie an Verbindungen E810 und E813 zu erkennen ist. Mit 41 mg/l und 33 mg/l erreicht diese die höchste Wasserlöslichkeit unter der gezeigten Verbindungen.

7.5. Cytotoxizitäts-Test (SRB-Test)

Für den SRB-Test werden Tumorzellen mit der zu untersuchenden Substanz für eine Dauer von drei Tagen inkubiert. Anschließend wird das verbliebene Lebendprotein mit 10 %-iger Trichloressigsäure (TCA) fixiert, und die abgestorbenen Zellen mit kaltem Wasser weggespült. Das verbliebene Lebendprotein wird nun mit dem Farbstoff Sulforhodamin B gefärbt.

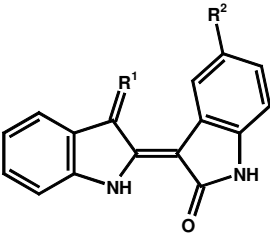
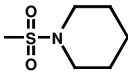
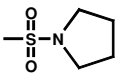
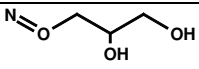
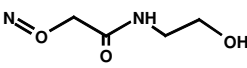
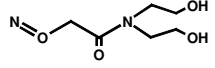
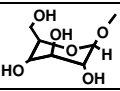
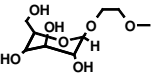
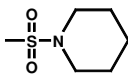

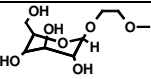
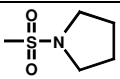
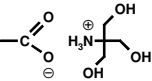
Tabelle 7-11 fasst die Ergebnisse des SRB-Tests für die untersuchten Verbindungen zusammen.

Die Verbindungen E800 und E801, die über eine Piperidin-1-sulfonyl- bzw. Pyrrolidin-1-sulfonylgruppe in Position 5 verfügen, zeigen mit IC_{50} -Werten $> 10 \mu M$ eine nur geringe Cytotoxizität. Auch E808 und E811, welche zusätzlich zur Sulfonamidgruppe eine Glucopyranosyl-oxyethyl-Einheit in Position 3' tragen, zeigen IC_{50} -Werte $> 10 \mu M$. Vergleicht man diese Werte mit dem entsprechenden IC_{50} -Wert von E671, welcher bei $4 \mu M$ liegt, so scheint das Einführen des Sulfonamid-Substituenten zu verringerten cytotoxischen Eigenschaften der Verbindungen zu führen.

E804, E805 und E806 sind mit IC_{50} -Werten von $0,1 \mu M$, $0,3 \mu M$ und $0,9 \mu M$ potente Hemmstoffe der Zellproliferation an der MCF-7 Zelllinie, wobei die ansteigenden Beträge der IC_{50} -Werte mit denen der CDK2-Hemmung korrelieren (siehe Kapitel 7.3.1).

E810 weist trotz des ionischen Charakters der Carboxylatgruppe mit $2,7 \mu M$ einen geringfügig niedrigeren IC_{50} -Wert als Verbindung E807 auf, deren IC_{50} -Wert $3,5 \mu M$ beträgt, und die statt der Carboxylatgruppe eine Glucose-Einheit an Position 5 trägt. Scheinbar wird die Zellpermeabilität des Indirubins durch die Carboxylatgruppe deutlich weniger beeinträchtigt als durch die Sulfonatgruppe, welche bei E226 zu einem IC_{50} -Wert für den SRB-Test an MCF-7 Zellen von mehr als $30 \mu M$ führt.

Tabelle 7-11: IC₅₀-Werte für die Bestimmung der Cytotoxizität von Indirubinderivaten an MCF-7 Zellen mittels SRB-Test

Substanz			IC ₅₀ [μM] an MCF-7
	R1	R2	
E800	O		> 10
E801	O		> 10
E804		H	0,1
E805		H	0,3
E806		H	0,9
E807	O		3,5
E808			> 10
E810	O		2,7
E811			> 10
E813	O		> 10(Zelllinie: LXFL)

8. Zusammenfassung

Anfangs als potente Inhibitoren Cyclin abhängiger Kinasen identifiziert, erweisen sich Indirubin und dessen Derivate im Zuge zahlreicher Untersuchungen immer mehr als biologisch aktive Verbindungen, die in der Lage sind, mehrere für die Tumorgenese relevante Targets zu inhibieren. Neben der Hemmung der Cyclin abhängigen Kinasen und der GSK-3 β konnte so für einige Indirubin-Derivate auch eine Hemmung der durch STATs vermittelten Transkription verschiedener antiapoptotischer Proteine nachgewiesen werden, wobei für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierte E804 eine direkte Hemmung der Nichtrezeptor-Tyrosinkinase c-src gezeigt werden konnte [Nam et al., 2004]. Auch eine Hemmung der VEGF-Rezeptor-Aktivität konnte für einige Indirubin-Derivate gezeigt werden [Jautelat, R, 2002].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss von Hydroxygruppen bei Substituenten in 3'- und 5-Position des Indirubins auf die Enzymaktivität und die Löslichkeit untersucht werden. So wurde an der 3'-Position ein Butanol- ein Propandiol-, ein Ethanol-acetamid- und Diethanol-acetamid- Rest als Oximether-Substituent eingeführt, während an der Position 5 eine glycosidisch gebundene Glucose-Einheit eingeführt wurde. Weiterhin wurde in Position 5 eine Carbonsäuregruppe eingeführt, woraus 5-Carboxy-indirubin E810 und dessen Tris-Salz E813 resultierten. Letztere zeigen mit einem Wert von 41 und 33 mg/l die beste Wasserlöslichkeit, wohingegen für die restlichen Derivate mit Werten von 1 bis 5 mg/l die Wasserlöslichkeit durch Einführung von Substituenten mit Hydroxygruppen gegenüber dem Indirubin mit einer Löslichkeit von etwa 0,1 mg/l nur geringfügig verbessert werden konnte.

Bei der Hemmung des CDK2/CycE-Komplexes liegen die IC₅₀-Werte der entwickelten Verbindungen zwischen 0,2 und 3,3 μ M, wobei E803 die schwächste und E804 die stärkste Hemmung zeigt.

Auch an der GSK-3 β zeigt sich E804 mit einem IC₅₀-Wert von 0,1 μ M als potenter Inhibitor, jedoch verfügt E810 mit einem IC₅₀-Wert < 0,05 μ M an diesem Enzym über die stärkste Hemmwirkung der getesteten Substanzen. E808 mit einem IC₅₀-Wert > 5 μ M vermag hingegen das Enzym nur in geringem Maße zu hemmen.

Ebenso wie in den Untersuchungen an der CDK2 und der GSK-3 β , erwies sich E804 mit einem IC₅₀-Wert von 0,1 μ M auch im Cytotoxizitätstest an der MCF-7 Zelllinie als potente Verbindung, gefolgt von E805 und E806, deren IC₅₀-Werte bei 0,3 bzw. 0,9 μ M liegen. Eine

etwas geringere Cytotoxizität zeigten hingegen die Verbindungen E807 und E810, deren IC_{50} -Werte bei 3,5 bzw. 2,7 μM liegen. Die Sulfonamidgruppen enthaltenden Substanzen E800, E801 und E808 zeigen in diesem Test mit IC_{50} -Werten von $>10 \mu M$ die weitaus schwächste Cytotoxizität.

Fazit/Ausblick

Indirubine greifen an verschiedenen Punkten in die Regulation zellulärer Prozesse ein. Diese Eigenschaft kann einen entscheidenden Vorteil für einen eventuellen Einsatz in der Antitumor-Therapie darstellen, da ein Ausweichen der Tumorzelle auf andere Signalwege erschwert, und die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Resistenz des Tumors gegen das Therapeutikum verringert wird.

Ein kritischer Punkt bei der Entwicklung von Indirubinderivaten als Antitumorwirkstoffe ist die Bioverfügbarkeit, welche über die Erhöhung der Wasserlöslichkeit durch das Einführen Hydroxygruppen-haltiger Substituenten im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt verbessert werden konnte. Analog zur Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen muss auch der Zusammenhang zwischen Struktur und Wasserlöslichkeit untersucht werden. Ansonsten müssten Verfahren entwickelt werden, welche die Solubilisierung von schlecht löslichen Substanzen, z.B. durch Micellenbildung, ermöglichen.

9. Experimenteller Teil

9.1. *Geräte und Materialien*

9.1.1. **Chemikalien/Geräte/Materialien für die Synthese**

Vakuumpumpe: Drehschieber-Vakuumpumpe (Fa. Vacuubrand)

Ultraschallbad: Sonorex RK 102H (Fa. Bandelin)

Waage: Satorius laboratory

Rotationsverdampfer: Rotivapor R110 und Vakuumcontroller B161 (beides Fa. Büchi)

Dünnschichtchromatographie

DC-Kieselgel-Folien: DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck)

Säulenchromatographie

Säulenmaterial: Kieselgel 60 (0,063-0,2mm) (Fa. Macherey & Nagel)

Die für die Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Aldrich, Merck, Lancaster und Acros bezogen. Die Lösungsmittel hatten p.a.-Qualität oder wurden wenn nötig getrocknet und frisch destilliert.

Als Schutzgas wurde Argon 4.8 der Firma Messer-Griesheim verwendet, Reinheit >99,998%, getrocknet über Phosphorpentoxid.

Zur analytischen Untersuchung der synthetisierten Verbindungen wurden folgende Geräte eingesetzt:

β-counter: Multichannel beta Spectrometer, Beckman

Photometer: Cary 1 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian

NMR-Spektroskopie: AC200 und AMX400 der Firma Bruker

Die chemischen Verschiebungen sind entsprechend der δ -Skala angegeben, die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgt in Hertz (Hz).

Zur Angabe der Spinmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, pd = pseudodublett, pt = pseudotriplett, q = Quartett, quint = Quintett, sext = Sextett, sept = Septet, m = Multiplett

Als Standard werden die für die eingesetzten deuterierten Lösungsmittel charakteristischen Signale verwendet:

DMSO- d_6 : $^1\text{H} \rightarrow \delta=2,49\text{ppm}$ $^{13}\text{C} \rightarrow \delta=39,7\text{ppm}$

CDCl_3 : $^1\text{H} \rightarrow \delta=7,26\text{ppm}$ $^{13}\text{C} \rightarrow \delta=77,0\text{ppm}$

9.2. Synthesevorschriften und analytische Daten

9.2.1. Synthese der Indirubin-5-sulfonamid- Derivate

9.2.1.1. Synthese von Natrium-indirubin-5-sulfonat

Ausgangspunkt der Synthese der Indirubin-5-sulfonamide ist das Natriumsalz von Indirubin-5-sulfonat.

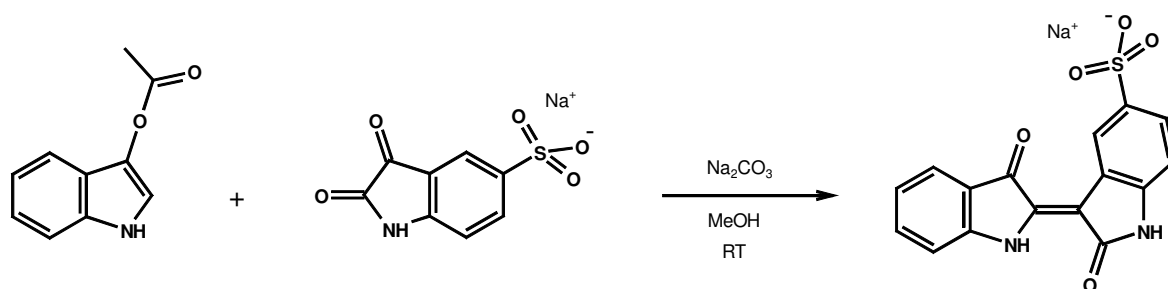


Abbildung 9-1: Synthese des Indirubin-5-sulfonats

700 mg (2,8 mmol) Isatin-5-sulfonat (Natriumsalz) werden unter Schutzgas in 25 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 418 mg (2,38 mmol) Indoxylacetat und 545 mg (5,14

mmol) Na_2CO_3 wird 24 h bei RT gerührt. Danach wird der entstandene Niederschlag abgenutscht, mit wenig Methanol gewaschen und getrocknet (Ausbeute: 73%)

9.2.1.2. Synthese von Indirubin-5-sulfonsäurechlorid

2 g (8,02 mmol) Indirubin-5-sulfonat (Natriumsalz) werden in 40 ml Thionylchlorid erhitzt. Nach Zugabe einer katalytischen Menge Dimethylformamid (DMF) wird 5 h bei 80 °C gerührt. Danach wird auf Raumtemperatur abgekühlt, das Reaktionsgemisch auf Eiswasser geschüttet und anschließend abgenutscht (Ausbeute: 80%).

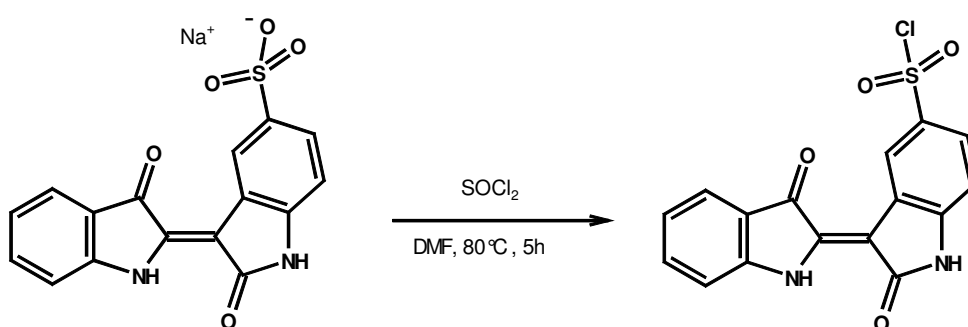


Abbildung 9-2: Synthese des Indirubin-5-sulfonsäurechlorids

9.2.1.3. Synthese von 5-(Piperidin-1-sulfonyl-)indirubin

500 mg (1,38 mmol) Indirubin-5-sulfonsäurechlorid werden in 200 ml eines Wasser-Piperidin Gemisches (Piperidin-Anteil: 17 %) 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird abgenutscht und mit Methanol und Wasser gewaschen (Ausbeute: 39%).

R_f -Wert: 0,55 (EE:Hex = 3:1)

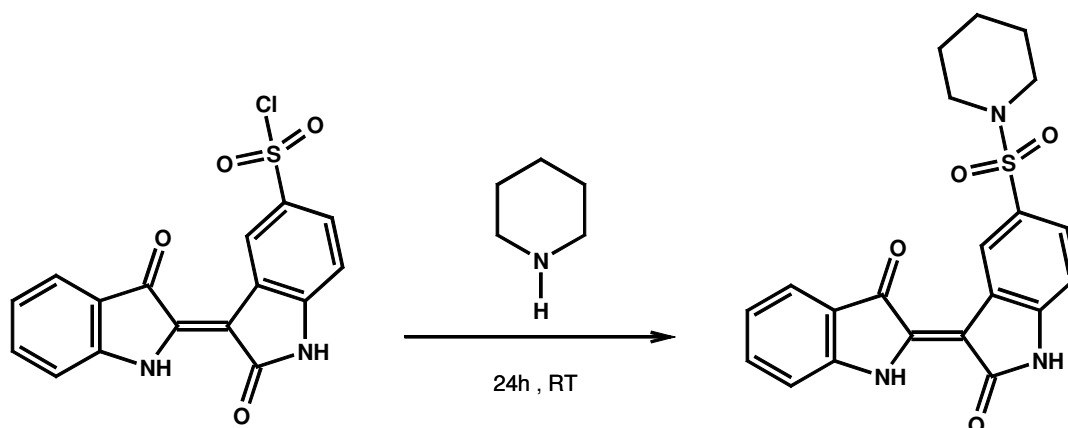


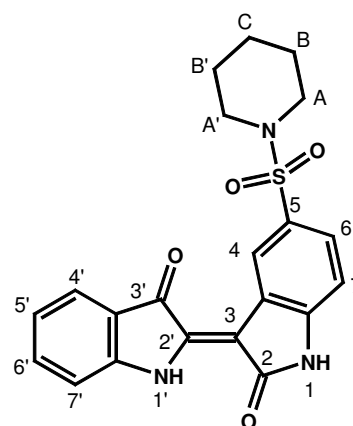
Abbildung 9-3: Synthese des 5-(Piperidin-1-sulfonyl-)indirubin

Tabelle 9-1: ^1H -NMR-Daten des 5-(Piperidin-1-sulfonyl)-indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,33	s, 1H	N1H oder N1'H
11,18	s, 1H	N1H oder N1'H
9,17	d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1,8\text{Hz}$	C4H
7,69	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,7\text{Hz}$	C4'H
7,59-7,61	m, 2H	C6'H, C7'H
7,43	d, 1H $^3J_{\text{H,H}} = 8,1\text{Hz}$	C6H
7,08	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1\text{Hz}$	C7H
7,04	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,7\text{Hz}$	C5'H
2,90	Breites Singulett, 4H	„A“
1,55	Breites Singulett, 4H	„B“
1,33	Breites Singulett, 2H	„C“

Tabelle 9-2: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-(Piperidin-1-sulfonyl)-indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
189,5	C3'
171,1	C2
152,6	C2'
144,1	C7a
139,9	C7a'
137,6	C6'
128,7	C4
128,1	C5
124,9	C4'
123,8	C6
122,1	C3a
121,9	C3a'
119,2	C5'
113,9	C7'
109,7	C7
104,5	C3
46,8	A
24,9	B
23,1	C



9.2.1.4. Synthese von 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl)-indirubin

500 mg (1,38 mmol) Indirubin wurden in 100 ml eines Wasser-Pyrrolidin Gemisches (Pyrrolidin-Anteil: 20 %) 5 h bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend abgenutscht (Ausbeute: 51 %).

R_f -Wert: 0,44 (EE:Hex = 3:1)

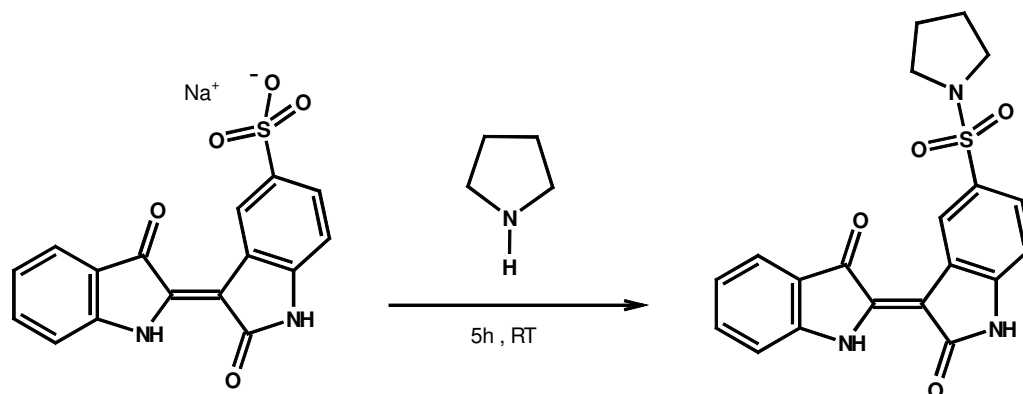


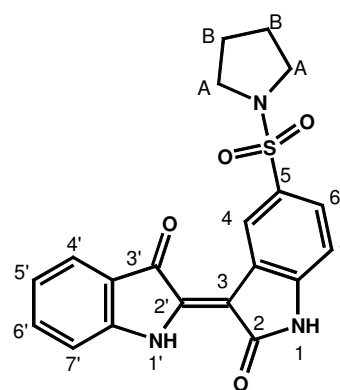
Abbildung 9-4: Synthese des Indirubin-5-sulfonsäure-pyrrolidinamid

Tabelle 9-3: ^1H -NMR-Daten des 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl-)indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,31	s, 2H	N1H , N1'H
9,25	s, 1H	C4H
7,66-7,70	m, 2H	C4'H , C6'H
7,57-7,16	m, 1H	C7'H
7,43	d, 1H	C6H
7,03-7,09	m, 2H	C7H , C5'H
3,15-3,18	m, 4H	„A“
1,65	quint, 4H	„B“

Tabelle 9-4: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-(Pyrrolidin-1-sulfonyl-)indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
189,0	C3'
170,9	C2
152,5	C2'
143,8	C7a
139,7	C7a'
137,4	C6'
128,6	C4
128,4	C5
124,7	C4'
123,4	C6
121,9	C3a
121,8	C3a'
119,0	C5'
113,7	C7'
109,5	C7
104,4	C3
46,8	A
24,9	B



9.2.2. Synthese der Indirubin-3'-oxim – Derivate

Die Indirubin-3'-oxim-Derivate werden ungeachtet eines eventuell vorhandenen Substituenten (**R**) in Position 5 immer nach folgendem Schema hergestellt:

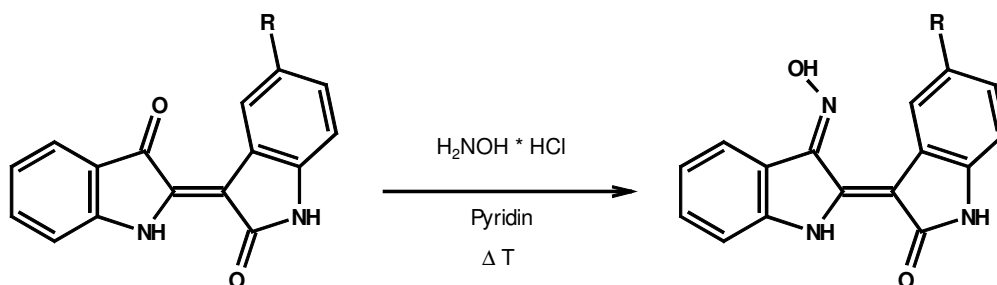


Abbildung 9-5: Synthese von Indirubin-3'-oxim-Derivaten

9.2.2.1. Synthese von Indirubin-3'-oxim

500 mg (1,91 mmol) Indirubin und 350 mg (5,04 mmol) Hydroxylamin-Hydrochlorid werden in 20 ml Pyridin etwa 1,5 h unter Rückfluß gerührt. Das Reaktionsgemisch wird dann nach Abkühlung auf Raumtemperatur in 100 ml 1 N HCl gegeben, die entstehenden roten Flocken abfiltriert, und erneut in 150 ml 1 N NaOH gelöst. Die erhaltene Lösung wird filtriert, und das Filtrat bis zur sauren Reaktion mit 1 N HCl versetzt. Die erneut ausfallende Substanz wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, und getrocknet (Ausbeute: 79 %).

DC: (Hexan:Essigester 1:1) R_f -Wert: 0,55

9.2.2.2. Synthese von 3'-Hydroxyimino-5-(piperidin-1-sulfonyl-)indirubin

Analog zu 9.2.2.1

(Ausbeute: 82 %)

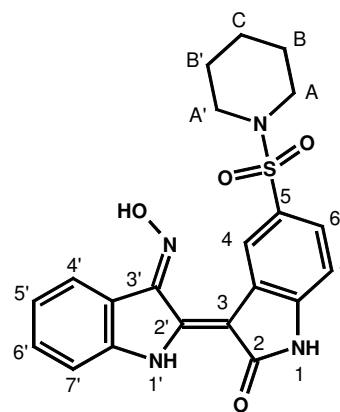
DC: (Hexan:Essigester 1:1) R_f -Wert: 0,63

Tabelle 9-5: ^1H -NMR-Daten des 3'-Hydroxyimino-5-(piperidin-1-sulfonyl-) indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
13,69	s, 1H (sehr breit)	N-OH
11,98	s, 1H	N1H
10,18	s, 1H	N1'H
8,92	s, 1H	C4H
8,26	d, 1H ; 7,54Hz	C4'H
7,39-7,49	m, 3H	C6'H , C7'H, C6H
7,05-7,08	m, 2H	C7H, C5'H
2,91	s, 4H (breit)	A+A'
1,53	s, 4H (breit)	B+B'
1,31	s, 2H (breit)	C

Tabelle 9-6: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 3'-Hydroxyimino-5-(piperidin-1-sulfonyl-) indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,8	C2
152,7	C3'
147,8	C2'
145,4	C7a
142,1	C7a'
133,0	C6'
129,1	C4
128,3	C5
126,4	C4'
123,8	C6
123,0	C3a
122,5	C3a'
117,5	C5'
112,7	C7'
109,4	C7
98,2	C3
47,6	A
25,7	B
23,9	C



9.2.2.3. Synthese von 3'-Hydroxyimino-5-(pyrrolidin-1-sulfonyl-) indirubin

Analog zu 9.2.2.1

(Ausbeute: 80 %)

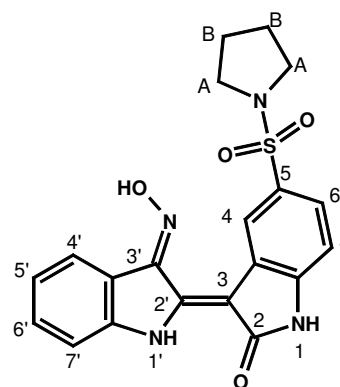
DC: (Hexan:Essigester 1:1) R_f -Wert: 0,58

Tabelle 9-7: ^1H -NMR-Daten des 3'-Hydroxyimino-5-(pyrrolidin-1-sulfonyl-) indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
13,69	s, 1H	N-OH
11,88	s, 1H	N1H
11,18	s, 1H	N1'H
8,98	s, 1H	C4H
8,27	d, 1H ; 7,70Hz	C4'H
7,57	d, 1H, 8,09Hz	C6'H ,
7,41-7,44	m, 2H	C7'H, C6H
7,04-7,08	m, 2H	C7H, C5'H
3,16	s, 4H	A+A'
1,60	s, 4H	B+B'

Tabelle 9-8: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 3'-Hydroxyimino-5-(pyrrolidin-1-sulfonyl-) indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,1	C2
152,1	C3'
147,0	C2'
144,7	C7a
143,9	C7a'
132,4	C6'
128,4	C4
127,9	C5
126,7	C4'
123,2	C6
123,2	C3a
122,3	C3a'
116,8	C5'
112,1	C7'
108,8	C7
97,5	C3
48,1	A
24,7	B



9.2.3. Synthese der Indirubin-3'-hydroxyalkyl-oximether

9.2.3.1. Synthese von Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether

150 mg (0,54 mmol) Indirubin-3'-oxim werden in 3 ml Ethanol suspendiert. Nach Zugabe von 587 mg (5,4 mmol) 4-Chlorbutanol und 498 mg (4,3 mmol) TMG wird 1,5 h in der Siedehitze gerührt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der erhaltene Niederschlag abgenutscht, und mit wenig Ethanol gewaschen.

(Ausbeute: 68 %)

DC: (Hexan:Essigester 1:1) R_f -Wert: 0,42

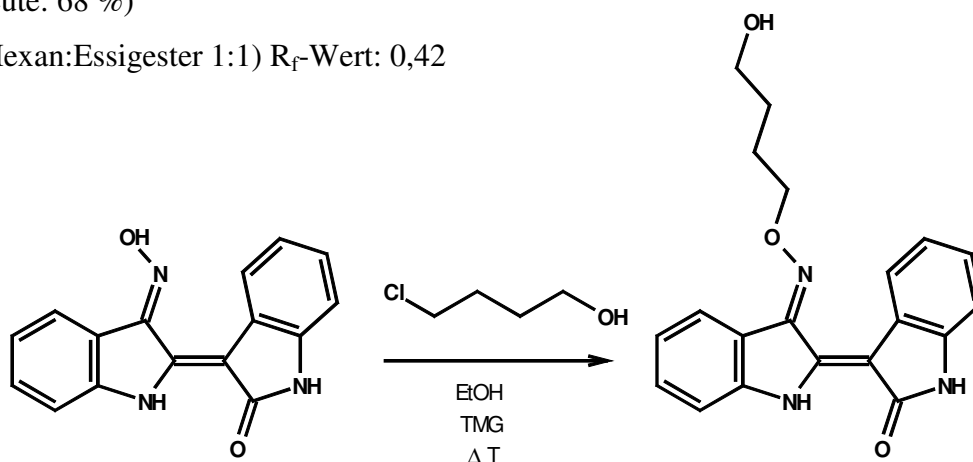


Abbildung 9-6: Synthese von Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether

Tabelle 9-9: ^1H -NMR-Daten des Indirubin-3'-(4-hydroxybutyl)-oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,68	s, 1H	N1H
10,74	s, 1H	N1'H
8,61	d, 1H ; 7,80Hz	C4H
8,11	d, 1H ; 7,63Hz	C4'H
7,38-7,44	m, 2H	C7'H , C6'H
7,12-7,16	m, 1H	C6H
6,96-7,05	m, 2H	C5' , C5
6,90	d, 1H ; 7,63Hz	C7H
4,61	t, 2H	„A“
4,5	t, 1H	OH
3,48	q, 2H	„B“
1,93	q, 2H	„D“
1,62	q, 2H	„C“

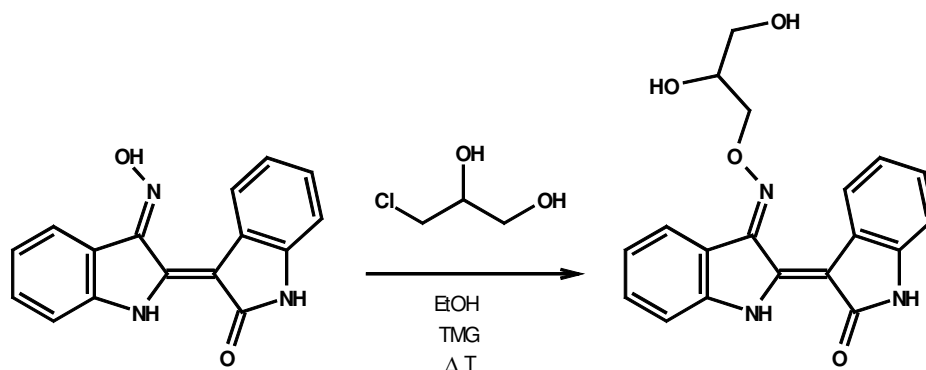


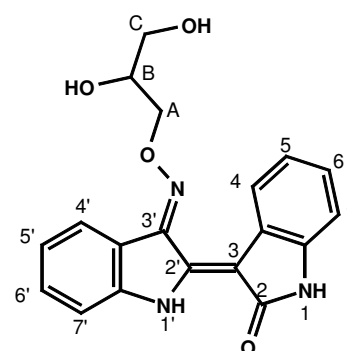
Abbildung 9-7: Synthese von Indirubin-3'-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether

Tabelle 9-11: ^1H -NMR-Daten des Indirubin-3'-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,68	s, 1H	N1H
10,75	s, 1H	N1'H
8,62	d, 1H ; 7,80Hz	C4H
8,18	d, 1H ; 7,63Hz	C4'H
7,39-7,45	m, 2H	C6'H , C7'H
7,12-7,16	m, 1H	C6H
6,96-7,05	m, 2H	C5'H, C5
6,90	d, 1H ; 7,79Hz	C7H
5,11	d, 1H ; 5,14Hz	„B“OH
4,80	t, 1H	„C“OH
4,63-4,68	m, 1H	„A“ H
4,49-4,53	m, 1H	„A“ H
3,97-4,04	sext, 1H	„B“ H
3,52	t, 2H	„C“ H

Tabelle 9-12: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des Indirubin-3'-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,1	C2
151,4	C3'
145,6	C2'
144,2	C7a
138,8	C7a'
133,0	C6'
128,6	C4
126,5	C5
123,6	C4'
122,5	C6
121,6	C3a
120,9	C3a'
116,5	C5'
111,9	C7'
109,1	C7



100,3	C3
78,9	A
70,2	B
63,0	C

9.2.4. Synthese der Indirubin-3'-(essigsäureamid)oximether

9.2.4.1. Synthese von Chloracet-ethanolamid

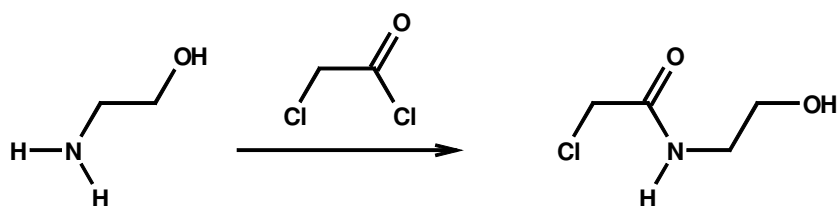


Abbildung 9-8: Synthese von Chloracetethanolamid

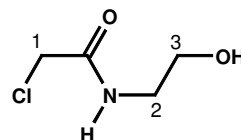
3 g Ethanolamin (49,1 mmol) werden in 45 ml einer 15%-igen wässrigen NaHCO_3 Lösung gelöst. Nach Zugabe von 30 ml CH_2Cl_2 wird die Lösung mit Eis gekühlt, und 4,5 ml (56,5 mmol) Chloressigsäurechlorid innerhalb von 10 Minuten zugetropft. Unter Rühren (ca. 5 h) wird die Reaktionsmischung auf RT erwärmen gelassen. Dann wird die wässrige Phase mit Essigester extrahiert, und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (Ausbeute: ca. 6% ; 3,1 mmol).

Tabelle 9-13: ^1H -NMR-Daten des Chloracet-ethanolamid

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
8,16	1H	NH
4,70	s, 1H	OH
4,04	s, 2H	CH_2 (Acetyl-)
3,39	t, 2H $^3J=5,98\text{Hz}$	$\text{CH}_2\text{-OH}$
3,15	q, 2H $^3J=5,92\text{Hz}$	N- CH_2

Tabelle 9-14: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des Chloracet-ethanolamid

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
167,7	C=O
61,1	CH_2OH
44,3	N CH_2
43,5	CH_2Cl



9.2.4.2. Synthese von Chloracet-diethanolamid

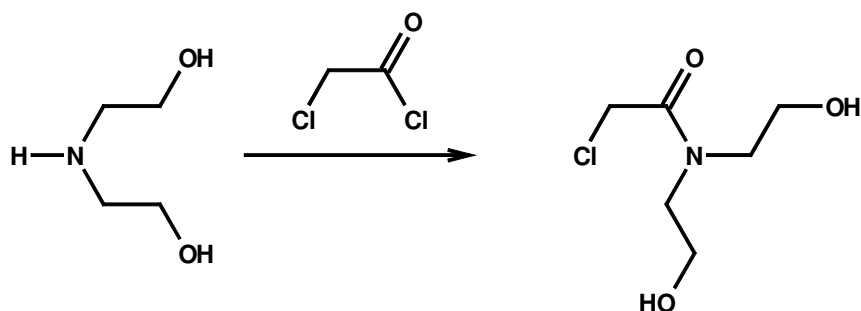


Abbildung 9-9: Synthese von Chloracet-diethanolamid

Die Darstellung erfolgt analog zu 9.2.4.1.

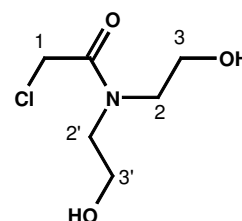
Statt 3 g Ethanolamin werden 5,2 g Diethanolamin (49,1 mmol) eingesetzt (Ausbeute: ca. 6% ; 2,8 mmol).

Tabelle 9-15: ^1H -NMR-Daten des Chloracet-diethanolamid

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
4,89	T, 1H, $^3J=5,22\text{Hz}$	OH
4,67	T, 1H, $^3J=5,39$	OH
4,41	S, 2H	CH_2 (Acetyl-)
3,52	Q, 2H, $^3J=5,75$	$\text{CH}_2\text{-OH}$
3,46	Q, 2H, $^3J=5,97$	$\text{CH}_2\text{-OH}$
3,40	T, 2H, $^3J=5,39$	N- CH_2
3,34	T, 2H, $^3J=5,06$	N- CH_2

Tabelle 9-16: $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des Chloracet-diethanolamid

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
166,4	C=O
59,0	CH_2OH
58,6	CH_2OH
50,8	N- CH_2
48,8	N- CH_2
42,7	CH_2Cl



9.2.4.3. Synthese von 3'-[(2-Hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

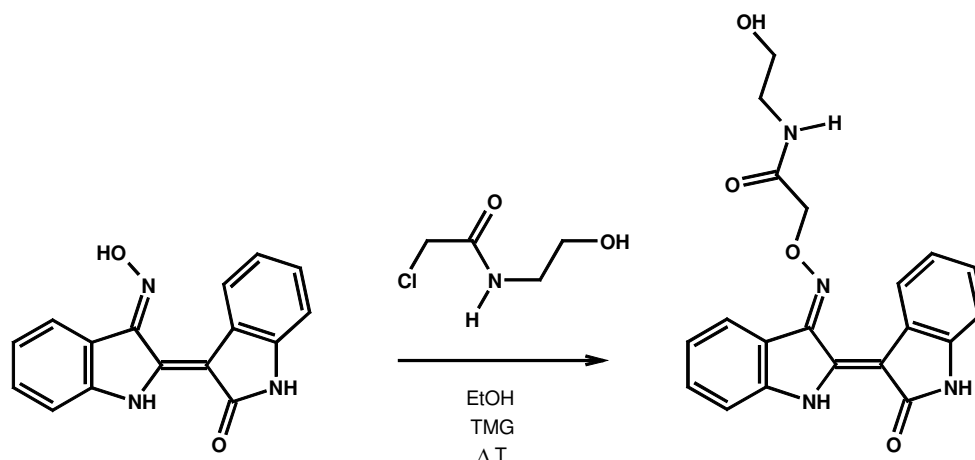


Abbildung 9-10: Synthese von 3'-[(2-Hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

120 mg (0,52 mmol) Indirubin-3'-oxim werden in 1 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 315 μ l (2,5 mmol) TMG werden 420 mg (3 mmol) Chloracetethanolamid (gelöst in 2 ml Ethanol) zugegeben und bei einer Temperatur von 90-100 °C unter Rückfluß gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird abgenutscht (Ausbeute: 73%).

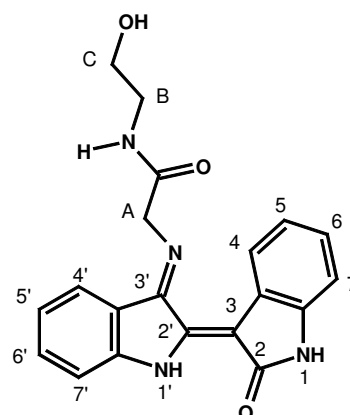
R_F-Wert: 0,52 (CH₂Cl₂ + 10% MeOH)

Tabelle 9-17: ¹H-NMR-Daten des 3'-[(2-Hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

δ [ppm]	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,65	s, 1H	N1H
10,75	s, 1H	N1'H
8,45	d, 1H ; 7,80Hz	C4H
8,19-8,20	m, 2H ; 7,47Hz	C4'H , NH Acetamid
7,39-7,46	m, 2H	C6'H , C7'H
7,11-7,15	m, 1H	C6H
7,01-7,05	m, 1H	C5'H
6,87-6,94	m, 2H	C7H, C5
4,98	s, 2H	CH ₂ des Acetamid „A“
4,69	t, 1H	OH
3,42	q, 2H	„C“
3,22	q, 2H	„B“

Tabelle 9-18: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 3'-[(2-Hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,0	C2
167,9	C=O (Acetamid)
152,4	C3'
145,8	C2'
143,8	C7a
138,9	C7a'
133,2	C6'
129,1	C4
126,7	C5
123,7	C4'
122,3	C6
121,5	C3a
120,8	C3a'
116,4	C5'
111,9	C7'
109,1	C7
100,8	C3
74,6	$\text{CH}_2(\text{Acetgruppe})$
59,9	CH_2OH
41,5	CH_2NH



9.2.4.4. Synthese von 3'-[Bis-(2-hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-] indirubin

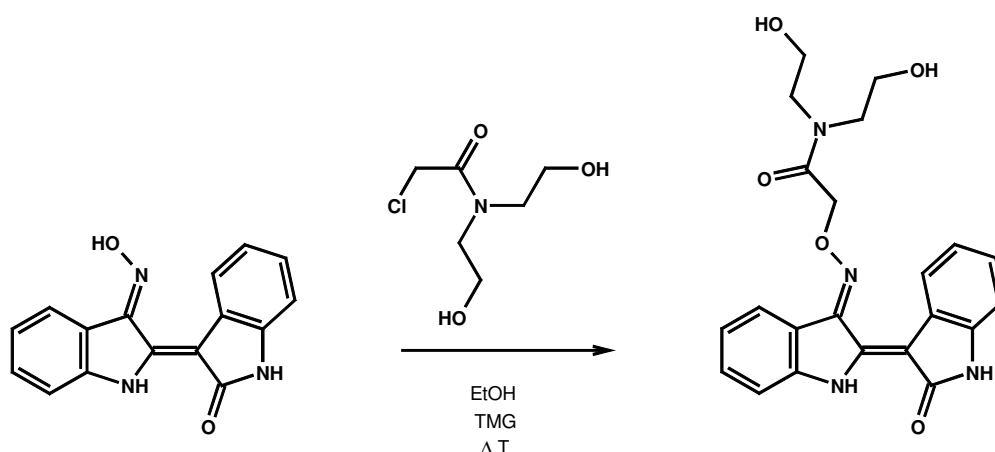


Abbildung 9-11: Synthese von 3'-[Bis-(2-hydroxyethyl)aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

Die Herstellung erfolgt analog zu 9.2.4.3 unter Verwendung von 105 mg (0,46 mmol) Indirubin-3'-oxim, 500 mg (2,8 mmol) Chloracet-diethanolamid und 290 μl (2,3 mmol) TMG in 2ml Ethanol (Ausbeute: 66%).

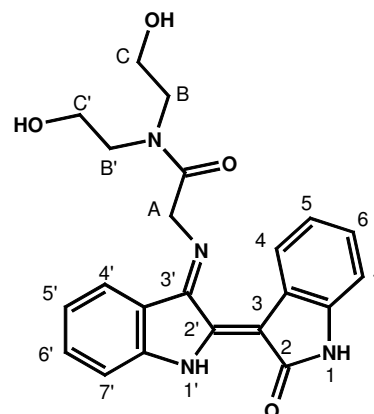
R_f -Wert: 0,41 (CH_2Cl_2 + 10% MeOH)

Tabelle 9-19: ^1H -NMR-Daten des 3'-[Bis-(2-hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,65	s, 1H	N1H
10,73	s, 1H	N1'H
8,45	d, 1H ; 7,71Hz	C4H
8,23	d, 1H ; 7,71Hz	C4'H
7,39-7,45	m, 2H	C6'H , C7'H
7,10-7,14	m, 1H	C6H
7,01-7,04	m, 1H	C5'H
6,93-97	m, 1H	C5H
6,87-6,90	m, 1H	C7H
5,39	s, 2H	CH_2 des Acetamid „A“
4,8	s, 2H (breit, kaum zu sehen)	2xOH
3,62	t, 2H	B
3,39-3,54	m, 4H	C, C'
3,41	t, 2H	B'

Tabelle 9-20: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 3'-[Bis-(2-hydroxyethyl)-aminocarbonylmethyl-oxyimino-]indirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,0	C2
167,8	C=O (Acetamid)
151,8	C3'
145,7	C2'
143,9	C7a
138,8	C7a'
133,1	C6'
128,9	C4
126,6	C5
123,9	C4'
122,4	C6
121,6	C3a
121,0	C3a'
116,4	C5'
111,9	C7'
109,0	C7
100,6	C3
73,6	$\text{CH}_2(\text{Acetgruppe})$
59,5	CH_2NH
58,9	CH_2NH
49,6	CH_2OH
48,3	CH_2OH



9.2.5. Synthese der Derivate der Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl-)oximether

9.2.5.1. Synthese von 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*- β -D-glucopyranosid

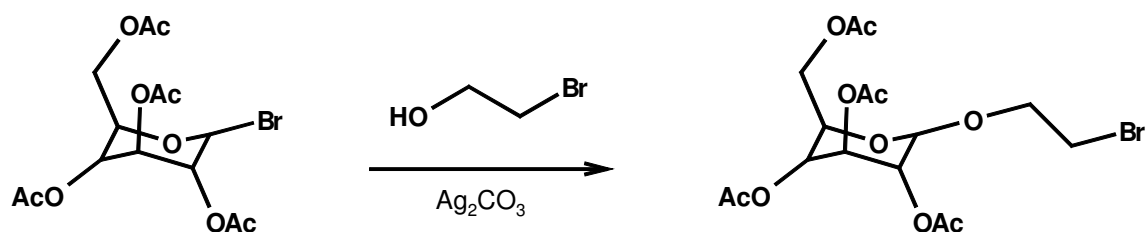


Abbildung 9-12: Synthese des 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*- β -D-glucopyranosid

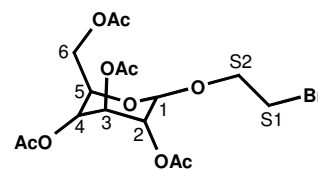
2 g (4,86 mmol) α -D-Acetobromoglucose werden in 3,5 ml (49,6 mmol) trockenem 2-Bromethanol gelöst. Nach Zugabe von 3,7 g (13,5 mmol) Silbercarbonat wird 24 h bei RT gerührt. Anschließend werden 5-10 ml CH_2Cl_2 zugegeben und abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum destilliert, und der Rückstand mit wenig Ethanol aufgenommen. Nach 24-stündiger Lagerung bei -20°C wird das Produkt in Form farbloser Nadeln abgenutscht (Ausbeute: 48%).

Tabelle 9-21: ^1H -NMR-Daten der 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*- β -D-glucopyranosid (in CDCl_3)

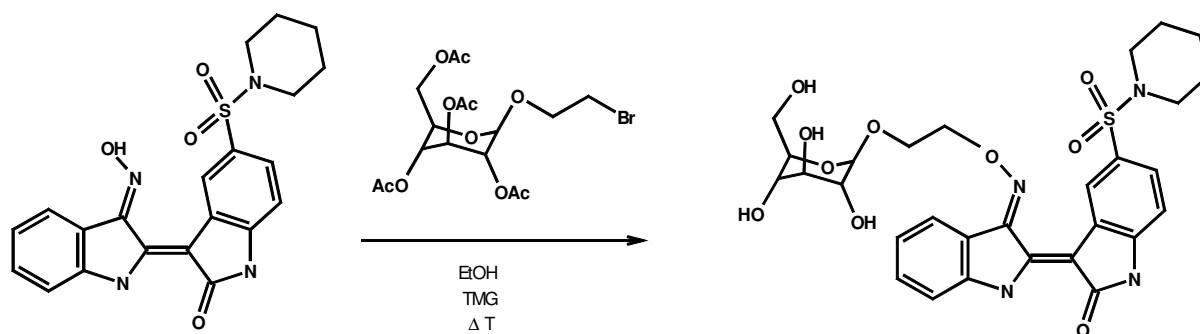
$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
5,22	d, 1H	C3H
4,99-5,08	m, 2H	C4H, C2H
4,57	d, 1H ; 7,92Hz	C1H
4,24-4,28	m, 1H	C6H
4,12-4,19	m, 1H	C6H
3,78-3,85	m, 2H	S2
3,69-3,73	m, 1H	C5H
3,44-3,48	m, 2H	S1
2,09	s, 3H	-CH ₃
2,07	s, 3H	-CH ₃
2,03	s, 3H	-CH ₃
2,01	s, 3H	-CH ₃

Tabelle 9-22: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten der 2-Bromethyl-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosid (in CDCl_3)

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
170,6	C=O
170,2	C=O
169,4	2x C=O
101,0	C1
72,6	2
71,9	3
71,0	6 - CH_2
69,8	5
68,3	4
61,8	O- $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -Br
29,8	O- CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -Br
20,7	2x - CH_3
20,6	2x - CH_3



9.2.5.2. Synthese von 5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl-) oximether

Abbildung 9-13: Synthese von 5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl-) oximether

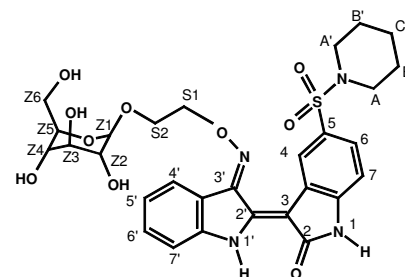
160mg (0,37 mmol) 5-piperidino-sulfonyl-indirubin werden in 5 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 100 μl TMG werden 360 mg (0,79 mmol) 2-Bromoethyl-tetra-acetyl- β -D-glucose zugegeben und etwa 5 h unter Sieden gerührt. Nach Zugabe von wenig Ethanol und 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank wird das Produkt abgenutscht und an der Vakuumpumpe getrocknet (Ausbeute: 46%).

Tabelle 9-23: ^1H -NMR-Daten des 5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,36	S, 2H	N1H und N1'H
9,07	s, 1H,	C4H
8,23	D, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,74\text{Hz}$	C4'H
7,46-7,52	m, 3H	C6'H, C7'H, C6H
7,09	D, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,12\text{Hz}$	C7H, C5'H
5,00	D, 1H	Z2OH
4,67 – 4,81	M, 4H	Z3OH, Z4OH, S2
4,42	M, 1H	Z6OH
4,30	M, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,93\text{ Hz}$	Z1H
4,19	m, 1H	Z6H(a)
4,00 – 4,13	M, 1H	Z6H(b)
3,87 – 3,91	M, 1H	Z2OH
3,64	M, 1H	Z3H
3,41 – 3,48	M, 3H	Z2, S1
3,18	M, 1H	Z4H
2,86	Breites singulett, 4H	„A“
1,55	Breites singulett, 4H	„B“
1,33	Breites singulett, 2H	„C“

Tabelle 9-24: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-(Piperidino-sulfonyl)-indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosyloxyethyl)-oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
170,9	C2
151,8	C3'
145,6	C2'
145,4	C7a
141,8	C7a'
133,1	C6'
128,8	C4
127,2	C5
126,1	C4'
122,6	C6
122,5	C3a
122,3	C3a'
116,3	C5'
112,2	C7'
109,0	C7
103,1	C1''
99,1	C3
77,0	C5''
76,9	C3''
76,3	$\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C1''}}$
73,4	C2''
70,2	C4''



66,9	C6''
61,3	CH ₂ -CH ₂ -O-C1''
46,7	A
24,8	B
23,0	C

9.2.5.3. Synthese von 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl-)oximether

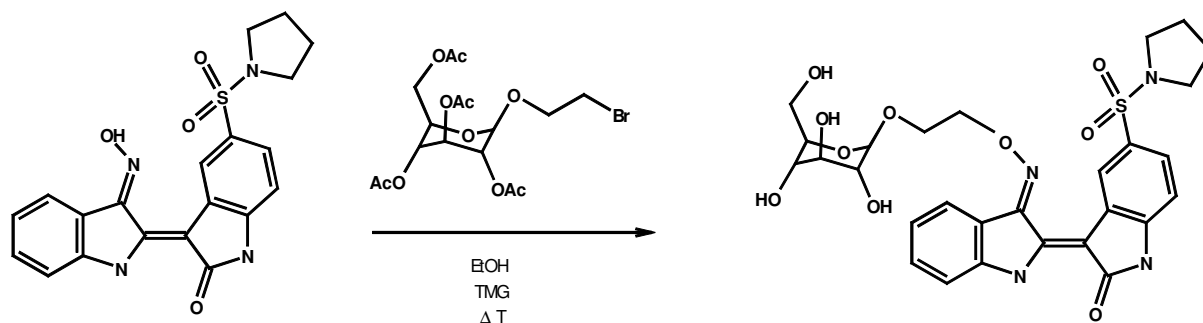


Abbildung 9-14: Synthese von 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl-)oximether

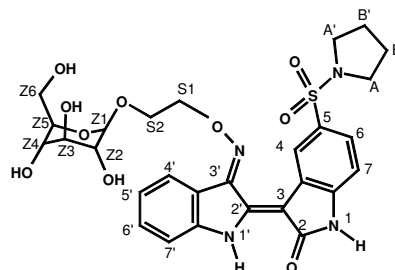
145mg (0,37 mmol) 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin werden in 5 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 100 µl TMG werden 360 mg (0,79 mmol) 2-Bromethyl-*tetra-O-acetyl*-β-D-glucopyranose zugegeben und etwa 5 h unter Sieden gerührt. Nach Zugabe von wenig Ethanol und 24-stündiger Lagerung im Kühlschrank wird das Produkt abgenutscht und an der Vakuumpumpe getrocknet (Ausbeute: 42%).

Tabelle 9-25: ¹H-NMR-Daten des 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl-)oximether

11,75	s, 1H	N1H oder N1'H
11,23	s, 1H	N1H oder N1'H
9,16	d, 1H ; 1,47 Hz	C4H
8,23	d, 1H ; 7,44 Hz	C4'H ,
7,59	dd, 1H ; 8,22 Hz ; 1,95 Hz	C6H
7,45-7,48	m, 2H	C6'H ,C7'H
7,05-7,10	m, 2H	C7H , C5'H
4,99	d, 1H	Z2OH
4,82 – 4,91	m, 4H	Z3OH, Z4OH, S2
4,44	t, 1H	Z6OH
4,31	d, 1H, 7,82 Hz	Z1H
4,21	m, 1H	Z6
3,99 – 4,05	m, 1H	Z6
3,62 – 3,70	m, 1H	Z5
3,37 – 3,50	m, 2H	Z3, Z2
3,03-3,15	m, 7H	A, A' Pyrrolidin, Z4, S1
1,62	t, 4H ; 6,66 Hz	B, B'

Tabelle 9-26: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-Pyrrolidino-sulfonylindirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl-)oximether

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
170,9	C2
151,7	C3'
145,6	C2'
145,3	C7a
141,7	C7a'
133,0	C6'
128,7	C4
127,7	C5
125,7	C4'
122,5	C6
122,5	C3a
122,2	C3a'
116,2	C5'
112,1	C7'
109,0	C7
103,0	C1''
98,5	C3
77,0	C5''
76,8	C3''
76,6	<u>CH</u> ₂ -CH ₂ -O-C1''
73,5	C2''
70,2	C4''
66,9	C6''
61,2	CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -O-C1''
47,8	A
24,6	B



9.2.6. Synthese des Indirubin-5-glucopyranosid

9.2.6.1. Synthese von 5-Hydroxy-isatin

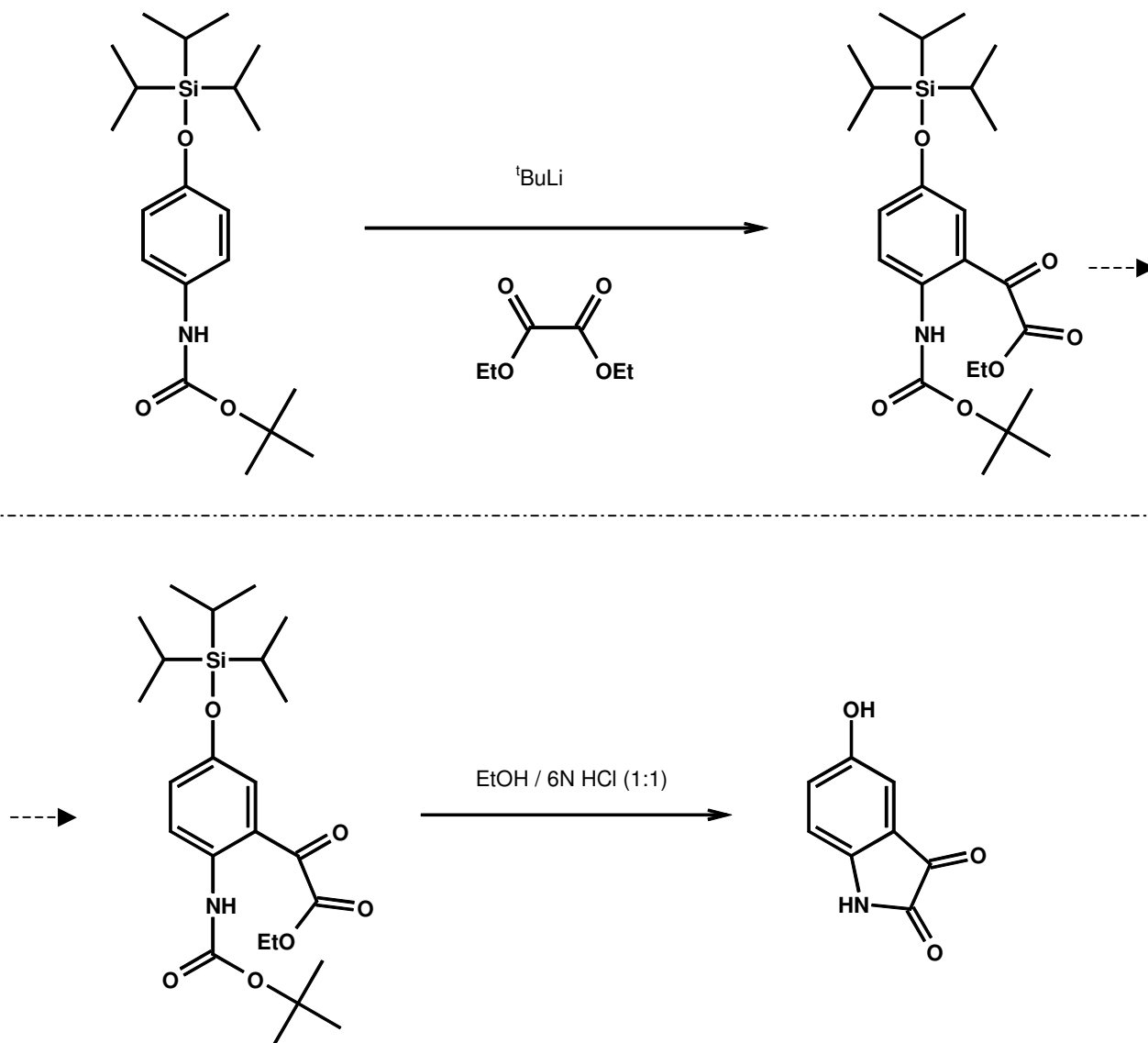


Abbildung 9-15: Synthese des 5-Hydroxy-isatin; Erläuterungen zum Reaktionsmechanismus im Text

In einem ausgeheizten, mit Argon befüllten Dreihalskolben werden 12,43 g (34 mmol) TIPS-BOC-geschütztes p-Aminophenol in 100 ml getrocknetem Ether gelöst. Nach Abkühlen auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eis-Salz Mischung) werden unter Rühren innerhalb von etwa 30 min. 50 ml einer 1,7 molaren $t\text{-BuLi}$ /Pentan Lösung (85 mmol) zugetropft, wobei die Temperatur nicht über $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigen sollte. Nach 2 h Rühren bei -20 bis $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden 6,1 ml (45 mmol) Oxalsäurediethylester (gelöst in 15ml getrocknetem Ether) innerhalb von 10 min. zugetropft, und

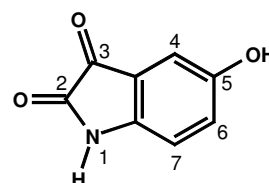
anschließend wieder 30 min. bei -18°C gerührt. Nachdem die Reaktionsmischung unter weiterem Rühren auf RT gekommen ist, wird sie vorsichtig mit 250 ml 1 N HCl versetzt und die wässrige Phase noch zwei mal mit 250 ml Ether extrahiert. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in einer Mischung aus 150 ml Ethanol und 150 ml 6 N HCl 1 h unter Rückfluss gekocht. Nach Erkalten der Mischung und Zugabe von 300 ml Essigsäureethylester wird nach Phasentrennung die wässrige Phase noch drei mal mit je 200 ml Essigsäureethylester extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird abrotiert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Tabelle 9-27: ^1H -NMR-Daten des 5-Hydroxy-isatin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
10,74	s, 1H	NH
9,55	s, 1H	OH
7,00	dd, 1H ; $^3J_{\text{H,H}} = 8,24\text{Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 2,74\text{ Hz}$	C6H
6,84	d, 1H , $^4J_{\text{H,H}} = 2,75$	C4H
6,74	d, 1H ; $^3J_{\text{H,H}} = 8,59\text{Hz}$	C7H

Tabelle 9-28: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-Hydroxy-isatin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
185,1	C3
159,7	C2
153,4	C5
143,3	C7a
125,3	C3a
118,4	C6
113,3	C7
110,7	C4



9.2.6.2. Synthese des Isatinyl-5-β-D-glucopyranosids

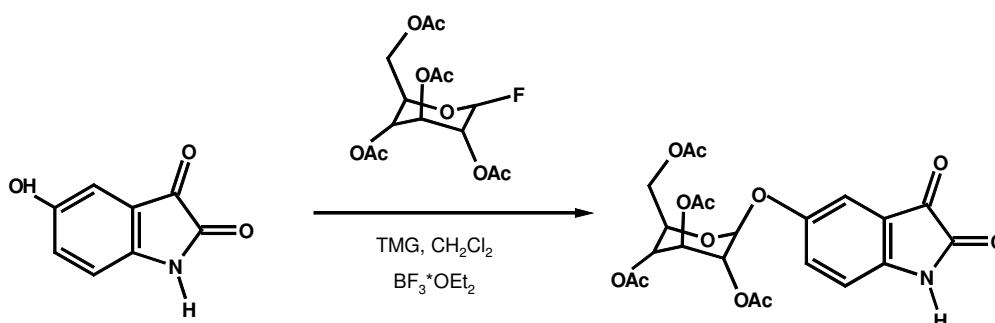


Abbildung 9-16: Synthese des Isatinyl-5-β-D-glucopyranosids

150 mg 5-Hydroxy-isatin ($M_r = 163,14$; 0,92 mmol) und 322 mg peracetylierte α -Fluoroglucopyranose ($M_r = 350,3$; 0,92 mmol) werden in 18 ml CH_2Cl_2 unter Zugabe von 347 μl TMG ($M_r = 115,18$; 2,76 mmol) und 462,2 μl $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ($M_r = 141,93$, $d = 1,13$; 3,68 mmol) 2 h bei RT in einem ausgeheizten 100 ml Kolben gerührt. Nach Zugabe von 30 ml ges. NaHCO_3 -Lösung wird das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt und mit drei mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird anschließend zwei mal mit gesättigter KHSO_4 -Lösung und einmal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, bei ca. 45°C abrotiert, und das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt.

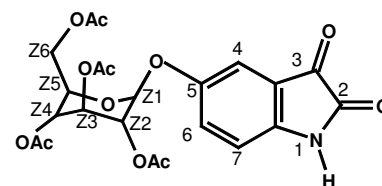
R_f -Wert: 0,44. (Fließmittel: EE:Hex/2,5:1); Ausbeute: ~37% (ca. 126 mg)

Tabelle 9-29: ^1H -NMR-Daten des Isatinyl-5-β-D-glucopyranosids

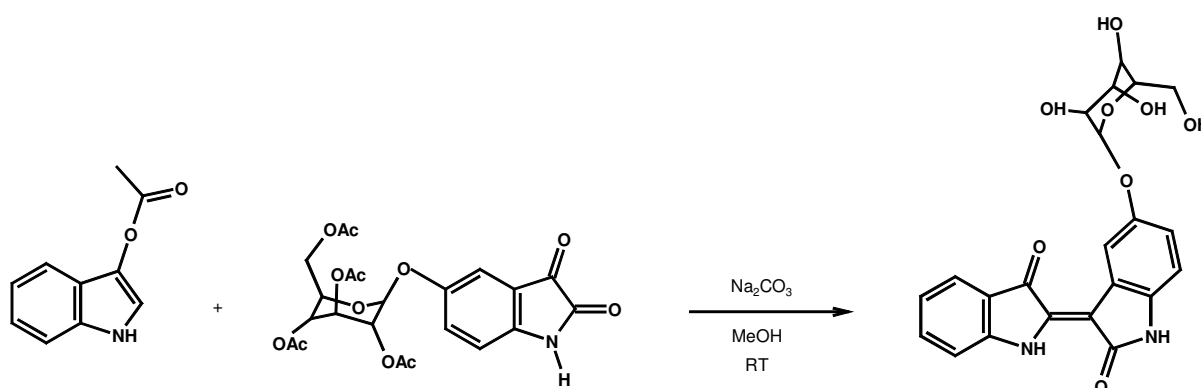
$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
10,94	s 1H	NH
7,19	dd, 1H ; 8,61 u 2,74	C6H
7,15	d, 1H ; 2,35Hz	C4H
6,85	d, 1H ; 8,22Hz	C7H
5,49	d, 1H ; 7,82Hz	Z1H
5,37	pt, 1H	Z5H
4,94-5,05	M, 2H	Z2, Z3
4,13-4,26	M, 2H	Z6(2H)
3,99-4,07	M, 2H	Z4H
2,03	s, 3H	-CH ₃
2,02	s, 3H	-CH ₃
2,00	s, 3H	-CH ₃
1,96	s, 3H	-CH ₃

Tabelle 9-30: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des Isatinyl-5- β -D-glucopyranosids

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
184,5	C3
170,2	$\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}=\text{O}$
169,7	$\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}=\text{O}$
169,5	$\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}=\text{O}$
169,3	$\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{C}}=\text{O}$
159,7	C2
152,3	C5
146,5	C4
127,5	C6
118,4	C7
113,4	C3a
112,2	C7a
97,9	C1
72,0	C2
71,1	C3
70,8	C4
68,3	C5
62,0	C6
20,6	$\underline{\text{CH}}_3\text{-C=O}$
20,6	$\underline{\text{CH}}_3\text{-C=O}$
20,5	$\underline{\text{CH}}_3\text{-C=O}$
20,5	$\underline{\text{CH}}_3\text{-C=O}$



9.2.6.3. Synthese des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids

**Abbildung 9-17:** Synthese des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids

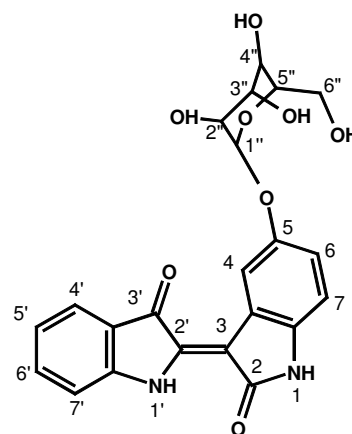
130 mg (0,36 mmol) Isatin-5-glucopyranosid werden unter Schutzgas in 7 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 55 mg (0,31 mmol) Indoxylacetat und 70 mg (0,66 mmol) Na_2CO_3 wird 24 h bei RT gerührt. Danach wird der entstandene Niederschlag abgenutscht und mit wenig Methanol gewaschen (Ausbeute: 71%).

Tabelle 9-31: ^1H -NMR-Daten des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
11,95	s (br), 2H	N1H und N1'H
8,56	d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2,44\text{Hz}$	C4H
7,64	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,50\text{Hz}$	C4'H
7,54-7,58	m, 1H	C6'H
7,40	d, 1H $^3J_{\text{H,H}} = 7,99\text{Hz}$	C7'H
6,97-7,02	m, 2H,	C7H, C6H
6,78	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,47\text{Hz}$	C5'H
4,79	D, 1H, 7,33Hz	Z1H
3,72	M, 1H	Z5H
3,56	M, 1H	Z6OH
3,22-3,40	M, 8H	8 Protonen des Zuckers

Tabelle 9-32: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des Indirubin-5- β -D-glucopyranosids

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
171,3	C2
152,8	C3'
152,7	C2'
138,7	C7a
137,4	C7a'
136,2	C6'
124,6	C4
122,3	C5
121,5	C4'
119,2	C6
117,6	C3a
114,0	C3a'
113,7	C5'
113,6	C7'
109,8	C7
107,2	C1''
101,7	C3
77,7	C5''
77,0	C3''
73,5	C2''
69,7	C4''
60,6	C6''



9.2.7. Synthese von 5-Carboxyindirubin

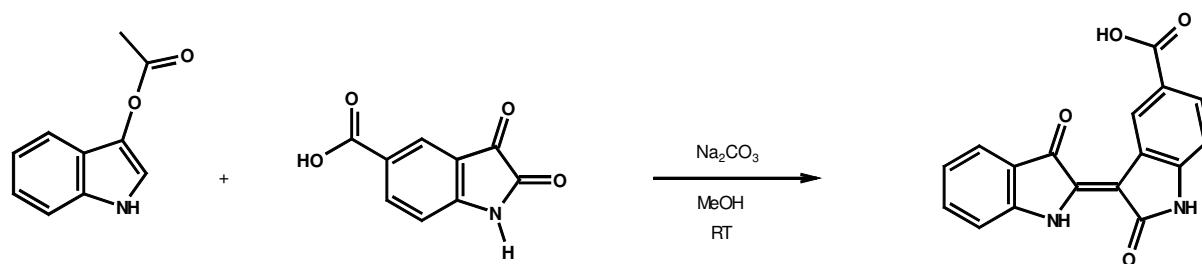


Abbildung 9-18: Synthese des 5-Carboxyindirubin

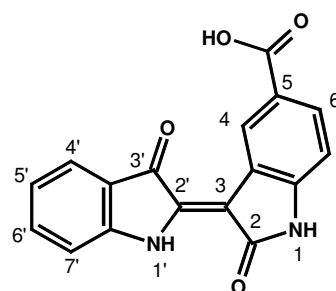
In einem ausgeheizten, mit Argon gefluteten Kolben werden 400 mg (2 mmol) 5-Carboxyisatin, 280 mg (1,6 mmol) Indoxylacetat und 390 mg (3,66 mmol) wasserfreies Natriumcarbonat in 20 ml Methanol 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 6 N HCl angesäuert, woraufhin sich ein Niederschlag bildet. Dieser wird abgenutscht und Wasser gewaschen (Ausbeute: 76%).

Tabelle 9-33: ^1H -NMR-Daten des 5-Carboxyindirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Signalform, Kopplung	Zuordnung
12,69	S, br., 1H	COOH
11,24	S, 1H	N1H oder N1'H
11,07	S, 1H	N1H oder N1'H
9,42	D, 1H; 1,57	C4H
7,87	Dd, 1H; $^3J = 8,03$ $^4J = 1,57$	C4'H
7,65	D, 1H; $^3J = 7,44$	C6'H
7,55-7,59	M, 1H	C7'H
7,41	D, 1H ; $^3J = 8,02$	C7H
6,96-7,05	M, 2H	C6H , C5'H

Tabelle 9-34: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR-Daten des 5-Carboxyindirubin

$\delta[\text{ppm}]$	Zuordnung
188,9	3'
171,4	2
167,8	COOH
152,7	2'
144,5	7a
139,3	7a'
137,4	6'
131,0	4
126,4	5
124,6	4'
124,0	6
121,8	3a
121,5	3a'
119,3	5'



113,7	7'
109,4	7
105,5	3

9.3. Biochemische Analytik

9.3.1. CDK2/CycE - Assay

Zur Bestimmung der inhibierenden Wirkung der Substanzen auf die CDK2-Aktivität wird ein rekombinanter CDK2/CycE - Komplex sowie das entsprechende Substrat, ein Histon H1 Protein, von der Firma „upstate“ verwendet.

Folgende weitere Lösungen werden für die Durchführung des Assays verwendet (sofern nicht anders angegeben, werden alle Lösungen mit H₂O bidest. hergestellt):

- Reaktionspuffer (RP)

Substanz	Endkonzentration im Assay
MOPS, pH 7,0	50 mM
EDTA	2,5 mM

- Assay Dilution Buffer (ADB)

Substanz	Endkonzentration im Assay
MOPS, pH 7,2	20 mM
β-Glycerophosphat	25 mM
EGTA	5 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
DTT	1 mM

- Mg²⁺-ATP-Lösung (ATP wird in Form von γ-³²P-ATP eingesetzt)

Substanz	Endkonzentration im Assay
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	75 mM
ATP	0,5 mM

Enzyme Dilution Buffer (EDB)

Substanz	Endkonzentration im Assay
MOPS, pH 7,0	20 mM
EDTA	1 mM
Glycerol	5 [%Vol]
Brij-35	0,01 [%Vol]
β -Mercaptoethanol	0,1 [%Vol]
BSA	1 mg/ml

Die für den Assay verwendeten Enzym- und Substrat-Lösungen haben folgende Konzentrationen:

- CDK2/CycE: 6 μ g/ μ l (Enzymkomplex verdünnt in EDB)
- Histon H1: 1mg/ml (in 20 mM MOPS, pH 7,0)

Die Probelösungen haben ein Gesamtvolumen von 25 μ l. Der Anteil der Einzelkomponenten ist im Folgenden aufgelistet:

Lösungsmittelkontrolle

- 10 μ l **DMSO** (1,25% in RP)
- 2,5 μ l Histon H1
- 2,5 μ l CDK2/CycE Komplex
- 10 μ l γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung

Substanzprobe

- 10 μ l **Substanz** (als 1,25%-ige DMSO-Lösung in RP)
- 2,5 μ l Histon H1
- 2,5 μ l CDK2/CycE Komplex
- 10 μ l γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung

Reaktionspufferkontrolle

- 12,5 µl **Reaktionspuffer** (RP)
- 2,5 µl Histon H1
- 10 µl γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung

Enzymkontrolle

- 10 µl Reaktionspuffer
- 2,5 µl Histon H1
- 2,5 µl CDK2/CycE Komplex
- 10 µl γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung

Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Pro zu messender Substanzkonzentration werden 2 Ansätze durchgeführt, deren Mittelwert zur Berechnung der Enzym-Hemmung verwendet wird.

Zunächst werden die entsprechende Substanzlösung und das Histon H1 Substrat in das Mikroreaktionsgefäß (=Eppi) pipettiert. Anschließend wird das Enzym so an die Wand des Eppis pipettiert, dass es nicht mit der Substanz und dem Substrat in Berührung kommt. Zuletzt wird das radioaktive γ -³²P-ATP so in den Eppi-Deckel gegeben, dass es nicht in Kontakt mit dem Enzym an der Eppi-Wand kommt. Um einen simultanen Start der Reaktion zu gewährleisten, werden alle für die Messung vorgesehenen Eppis kurz zentrifugiert und anschließend 10 min. in einem Thermomixer bei 37°C inkubiert. Danach werden die Eppis wieder auf Eis gestellt und 20 µl des Inhalts auf Phospho-Cellulose Sheets überführt. Die Aktivität der eingesetzten γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung entspricht dabei etwa 0,4 µCi pro Sheet. Nach dem die Phosphocellulose Sheets getrocknet sind, werden sie 3 mal 5 min. mit 0,75%-iger Phosphorsäure gewaschen. Nach einem letzten Wasch-Schritt mit Aceton werden sie wieder trocknen gelassen, in ein Szintillationsvial mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem β -Counter vermessen („Multichannel beta Spectrometer“, Beckman). Zusätzlich zu den Phosphocellulose Sheets werden noch zwei Kontrollwerte für die Aktivität des γ -³²P-ATP gemessen (=Leerwert). Hierzu werden 10 µl der γ -³²P-ATP – Mg²⁺ - Lösung zu 8 ml der Szintillationslösung gegeben.

Berechnung der Enzym-Aktivität:

Als Bezugswert für die Messergebnisse dient der Mittelwert der Lösungsmittel (DMSO) – Kontrolle, von welchem der Mittelwert der Reaktionspuffer-Kontrolle (Blindwert) subtrahiert wurde. Da die gemessene Aktivität nur von einem Teil des gesamten Assay-Volumens (20 µl von 25 µl) stammt, muss dies mit einem Korrekturfaktor (25/20) berücksichtigt werden. Es berechnet sich also die Aktivität des Bezugswertes (A_B) zu:

$$A_B = (\text{Mittelwert(DMSO)} - \text{Mittelwert(Blindwert)}) * (25/20) \text{ [counts per minute (cpm)]}$$

Bzw. die Aktivität einer Probelösung (A_{Probe}) zu:

$$A_{\text{Probe}} = (\text{Mittelwert(Probe)} - \text{Mittelwert(Blindwert)}) * (25/20) \text{ [cpm]}$$

10 µl der eingesetzten 0,5 mM γ - ^{32}P -ATP – Mg^{2+} - Lösung entsprechen 5 nmol ATP. Die auf ein Nanomol bezogene spezifische Aktivität (R) des Leerwertes entspricht also 1/5 des gemessenen Wertes:

$$R = \text{Mittelwert(Leerwert)} / 5 \text{ [cpm/nmol]}$$

Der Quotient aus der in der Probe ermittelten Aktivität (A_{Probe}) oder (A_B) und der spez. Aktivität R gibt Aufschluß darüber, wie viel des γ - ^{32}P -ATP von der CDK2 umgesetzt wurde. Da über einen Zeitraum von 10 min inkubiert wurde ergibt eine Division durch 10 den Umsatz pro Minute (P) an:

$$P = ((A_{\text{Probe}}) \text{ oder } (A_B) / R) * 1000/10 \text{ min [pmol/min]}$$

Die Umsatzrate wird letztlich noch auf die eingesetzte Menge des Enzyms bezogen (6 µg x 2,5 = 0,015 mg)

$$P_{\text{Protein}} = P / \text{eingesetzte Proteinmenge [pmol / min*mg]}$$

9.3.2. GSK3- β Assay

Die Methode des GSK3- β Assay ist analog zu der des CDK2/CycE – Assays. Da die Menge an eingesetzter Aktivität, Enzym und Substrat identisch sind, ändert sich auch die Berechnung der Enzymaktivität nicht. Als Substrat wurde jedoch nicht das Histon H1 Protein verwendet, sondern eine kurze Peptidkette der Sequenz RRAAEELDSRAG-pS-PQL (Biosyntan GmbH, # 3089). Dabei handelt es sich um ein Peptid, welches über einen Serin-Rest (an Position n) und einen phosphorylierten Serin-Rest (Position n+4) verfügt. Dieses Muster ist ein von der GSK3- β bevorzugtes Substratmuster (siehe Kapitel „Ausgewählte Targets von Indirubin-Derivaten“).

9.3.3. Zellkultur und Cytotoxizitätstest

9.3.3.1. Geräte

Analysenwaage	AE 163(Mettler)
EIA-Platereader	Biorad
Magnetrührer	Heidolph
Mikropipetten	Eppendorf
pH-Meter	521 (WTW)
Ultraschallbad	Sonorex RK 102H (Bandelin)
Vortex	Genie (Bender & Hobein)
Zellkultur	Biofreezer (Forma)
	Brutschrank: Cytoperm (Heraeus)
	Lichtmikroskop: Leitz Labovort
	Multipette: Eppendorf
	Neubauer Zählkammer
	Pipettierhilfe: Pipettus-Akku (Tecnorama)
	Sterile Werkbank: Laminar-Air HLB 2448 GS (Heraeus)
	Vakuumpumpe (KNF Neuberger)
	Dampfsterilisator: Varioklav 500 E (H+P Loabortechnik)
	Zellkultur-Verbrauchsmaterialien (Greiner, Sarstedt, Falcon)

9.3.3.2. Reagenzien

Zellkulturmedium: RPMI 1640 Medium (Firma Life Technology)
Weiterhin verwendet: Fötales Kälberserum (FKS) (Life Technology)
Penicillin/Streptomycin (10000 I.E. / 10.00 µg) (Life Technology)
Trypanblau (Serva)

Weitere für die Zellkulturen verwendete Reagenzien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Riedel de Han, ICN, Boehringer Mannheim, Bio-Rad, Merck, Promega und Calbiochem bezogen.

9.3.3.3. MCF-7 Zelllinie

Die für die Cytotoxizitäts-Untersuchungen verwendete MCF-7 Zelllinie wurde 1973 aus dem pleuralen Erguß einer 69 jährigen Patientin gewonnen, die an einem metastasierenden Mammakarzinom litt. Die MCF-7 Zelllinie ist gut differenziert und stellt mit einer ungefähren Verdopplungsdauer von 50 Stunden ein etabliertes Testsystem dar (Gottardis & Jordan, 1988).

9.3.3.4. Zellkultivierung

Die MCF-7 Zelllinie wird bei 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ in sterilem RPMI 1640 Medium kultiviert. Dem Medium wird vor Verwendung 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt werden. Das FKS wird vor der Verwendung 20 Minuten bei 56 °C inaktiviert.

9.3.3.5. Mediumwechsel

Das verbrauchte Medium wird abgesaugt, und die als Monolayer am Flaschenboden verbleibenden Zellen mit 2,5 ml – 5 ml vortemperiertem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden, abhängig von der Größe der Zellkulturflasche 30 ml – 50 ml frisches Medium hinzugegeben.

Der PBS (phosphate buffered saline) Puffer wird wie folgt angesetzt:

Tabelle 9-35: Reagenzien und deren Einwaagen zur Herstellung von 500 ml PBS-Puffer

Substanz	Einwaage
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄	0,72 g
KCl	0,125 g
KH ₂ PO ₄	0,125 g

Die Substanzen werden in 500 ml bidest. Wasser gelöst, auf pH 7,4 eingestellt, und autoklaviert.

9.3.3.6. Abtrypsinieren und Zellzahlbestimmung

Haben die Zellen in der Kulturflasche einen konfluenten „Zellrasen“ gebildet, so wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen, und nach dem Absaugen des PBS-Puffers mit 2,5 ml Trypsin-Lösung versetzt. Nach 30 Sekunden im Brutschrank werden die Zellen durch vorsichtiges Aufklopfen der Kulturflasche von deren Boden gelöst und nach Zugabe von 8 – 10 ml frischem Medium resuspendiert und vereinzelt. Um die Zellzahl in der erhaltenen Suspension zu bestimmen, werden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl Trypanblau versetzt, und das Gemisch auf eine Neubauer Zell-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wird dann die Zellzahl bestimmt.

Die verwendete Trypsinlösung wird wie folgt hergestellt:

Tabelle 9-36: Substanzen und deren Einwaagen zur Herstellung von 100 ml Trypsinlösung

Substanz	Verwendete Menge
Trypsin	52,12 mg
EDTA	25 mg
PBS	100 ml

Die Lösung wird über Nacht im Eisbad gerührt und anschließend sterilfiltriert.

9.3.3.7. Lagerung der Zellen

Die nach dem Abtrypsinieren erhaltene Zellsuspension wird bei 4 Minuten lang bei 200 g zentrifugiert. Das nach dem abdekantieren verbleibende Zellpellet wird so resuspendiert, dass die Zelldichte etwa 5×10^6 Zellen pro ml beträgt. Je ein Aliquot von 1 ml wird in ein Gryo-Röhrchen pipettiert, mit 0,1 ml DMSO versetzt, und nach dem Schließen des Röhrchens vorsichtig vermischt. Nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Biofreezer werden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

9.3.3.8. Auftauen der Zellen

Um die eingelagerten Zellen wieder zu verwenden, werden sie im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ schnell aufgetaut und mit Medium versetzt. Um das für das Einfrieren verwendete DMSO zu entfernen, werden die Zellen 4 Minuten bei 200 g zentrifugiert, und der Überstand abdekantiert. Das Zellpellet wird in Medium suspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

9.3.3.9. Mykoplasmen-Test

Mykoplasmen sind sich selbst vermehrende Mykoplasmen solch geringe Ausmaßes, dass sie die Membran eines Sterilfilters passieren können. Aus diesem Grunde müssen die Zellkulturen regelmäßig nach Mykoplasmen untersucht werden.

Dazu werden die Zellen auf einen Objekträger pipettiert und 24 Stunden anwachsen gelassen. Danach werden sie zur Fixierung etwa 1 Stunde mit eiskaltem Methanol inkubiert. Zur Färbung und Detektion vorhandener Mykoplasmen werden die Zellen mit einer Lösung aus DAPI, Proidiumiodid und Antifade-Puffer versetzt. Bedingt durch diese Farbstofflösung erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop die DNA blau, und Cytoplasmaproteine rötlich. Da Mykoplasmen über einen sehr hohen DNA-Gehalt verfügen, erscheinen sie als kleine Punkte im Cytoplsama und im Interzellularraum.

Die für den Mykoplasmen-Test verwendeten Lösungen werden wie folgt angesetzt:

Tabelle 9-37: Herstellung der für den Mykoplasmen-Test verwendeten Lösungen

Lösung	Herstellung
Antifade-Puffer	100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid werden in 10 ml PBS gelöst, der pH-Wert mit 0,5 M mit Carbonat-Dicarbonat Puffer auf 8,0 eingestellt, und mit Glycerin auf 100 ml aufgefüllt; Lagerung bei – 20 m°C
DAPI-Lösung	1 mg DAPI werden in 1 ml bidest. Wasser gelöst
Propidiumiodid-Lösung	1 mg Propidiumiodid werden in 1 ml bidest. Wasser gelöst
Färbe-Lösung	1 µl DAPI- und 1 µl Propidiumiodid-Lösung werden in 1ml Antifade-Puffer verdünnt

9.3.3.10. SRB-Test

Mit einer Zelldichte von etwa 4000 Zellen pro ml Medium werden die Zellen in 24-Loch-Platten pipettiert. Nach 24 Stunden wird das Medium abgesaugt, und durch Medium ersetzt, das die zu untersuchende Substanz in entsprechender Konzentration enthält. Als Lösungsvermittler wird diesem Medium DMSO zu einem Anteil von 0,1% zugesetzt. Nach drei Tagen Inkubation werden zur Fixierung der überlebenden Zellen in jedes Loch 100 µl kalte, 10 %-ige TCA-Lösung pipettiert, und 1 Stunde bei 4 °C gelagert. Tote Zellen werden danach mit kaltem Leitungswasser abgespült, und die Platte an der Luft trocknen gelassen. Zur Färbung des verbliebenen Zellproteins werden 250 µl einer 0,4 %-igen Sulforhodamin-B Lösung (gelöst in 1 %-iger Essigsäure) in jedes Loch pipettiert, und 30 Minuten auf den Zellen belassen. Anschließend werden die Platten mit 1 %-iger Essigsäure-Lösung gespült, und nach Lufttrocknung unter Lichtausschluss 1 ml TRIS-Base in jedes Loch gegeben, wodurch der an das Protein gebunden Farbstoff wieder freigesetzt wird. Die Farbstoff-Lösung wird dann in eine 96-Loch-Platte überführt, und im Photometer bei 570 nm vermessen. Die gemessene Extinktion ist dabei direkt proportional zur Zahl der überlebenden Zellen.

Verwendete Lösungen:

- 50 %-ige TCA-Lösung (Acros)
- 10 mM TRIS-Base (pH 10,5) (Boehringer Mannheim)
- 0,4 %-ige SRB-Lösung in 0,1 %-iger Essigsäure (Sigma)

9.3.4. Bestimmung der Wasserlöslichkeit

Zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit wurde eine Standard-Lösung der entsprechenden Substanz in Methanol p.a. hergestellt; die Konzentrationen bewegten sich dabei zwischen 4 und 6 mg/l. Von dieser Lösung wurde durch Verdünnungsschritte eine Standard-Eichreihe angesetzt. Zur Ermittlung des Absorptionsmaximums (im sichtbaren Bereich, 400 – 700 nm) wurde ein Wellenlängen-Scan mit der höchsten Standard-Konzentration durchgeführt. Für die Vorbereitung der Messprobe wurde die Substanz in Wasser gelöst. Dazu wurde eine gesättigte Lösung hergestellt, indem die Lösung/Suspension für einige Minuten in ein Ultraschallbad gestellt wurde, und anschließend 3 Tage über einem Magnet-Rührer gerührt wurde. Nach Zentrifugation wurde der Überstand photometrisch bei dem entsprechenden Absorptionsmaximum vermessen.

10. Literaturverzeichnis

- Arellano, M., Moreno, S. (1997) *Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle*, Int. J. Biochem. Cell Biol. Vol. 29 No.4, 559-573
- Baeyer, A. (1881) *Über die Verbindungen der Indigogruppe*, Chemische Berichte 14, 1741-50
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R. (2000) *STATs in oncogenesis*, Oncogene 19, 2474-2488
- Brown, N.R., Noble, M.E.M., Lawrie, A.M., Morris, M.C., Tunnah, P., Divita, G., Johnson, L.N., Endicott, J.A. (1999) *Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin dependent kinase 2 structure and activity*, J. Biol. Chem. 274, 8746-8756
- Buettner, R., Mora, L.B., Jove, R. (2002) *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*, Clin. Cancer Res. 8, 945-954
- Carson, B., Smith, A., Senderowicz, A., Sausville, E. (1996) *Flavopiridol, a new kinase inhibitor for tumor therapy*, Int. J. Onc. 9:1143-1168
- Cooperative group of clinical therapy of indirubin (1980), *Clinical studies of 314 cases of CML treated with indirubin*, Chinese J. Intern. Med. 1, 132-135
- Davies, T.G., Tunnah, P., Meijer, L., Marko, D., Eisenbrand, G., Endicott, J.A., Nobel, M.E.M. (2001) *Inhibitor binding to active and inactive CDK2: The crystal structure of CDK2-cyclin A/Indirubin-5-sulphonate*, Structure 9, 389-397
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J. (1998) *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*, Genes Dev. 12, 3499-3511
- Doble, B.W., Woodget, J.R. (2003) *GSK-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase*, Journal of cell science 116, 1175-1186
- Drees, M., Dengler, W.A., Roth, T., Labonte, H., Mayo, J., Malspies, L., Grever, M., Sausville, E., Fiebig, H.H. (1997) *Flavopiridol: Selective antitumor activity in vitro and in vivo for prostate carcinoma cells*, Clin Cancer Res 3: 273-279
- Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning (1913) *Verfahren zur Darstellung von Derivaten der Indirubine*, Patentschrift: DRP 283726
- Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W., Roach, P.J. (1987) *Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the*

- substrate. Molecular mechanism for the synergistic action casein kinase II and glycogen synthase kinase-3*, J. Biol. Chem. 262, 14042-14048
- Fischer, P.M., Lane, D.P. (2000) *Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Anti-Cancer Therapeutics*, Curr. Med. Chem. 7, 1213-1245
- Frame S., Cohen, P. (2001) *GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery*, Biochem. J. 359, 1-16
- Gottardis, M.M., Jordan, V.C. (1988) *Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long term antiestrogen administration*, Cancer Res 48, 5183-5187
- Harwood, A.J. (2001) *Regulation of GSK-3: A cellular Multiprocessor*, Cell, Vol 105, 821-824
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O., Woodget, J.R. (2000) *Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival NF- κ B activation*, Nature 406, 86-90
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E.M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L. (1999) *Indirubin, the active constituent of a chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin dependent kinases*, Nature Cell Biol. 1, 60-66
- Hoessel, R. (1999a) *Synthese von Derivaten des Indirubins und Untersuchungen zur Mechanismusaufklärung ihrer antineoplastischen Wirkung*, Dissertation
- Jacobs, S. (2002) *Beeinflussung cAMP-spezifischer Signalwege und Transkriptionsfaktoren in Tumorzellen*, Dissertation
- Jautelat, R., Brumby, T., Schäfer, M., Briem, H., Eisenbrand, G., Schwahn, S., Krüger, M., Lücking, U., Prien, O., Siemeister, G. (2005) *From the insoluble dye indirubin towards highly active, soluble CDK2-inhibitors*, ChemBioChem, 6, 531-540
- Johnson, D.G., Walker, C.L. (1999) *Cyclins and cell cycle checkpoints*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39, 295-312
- Jope, R.S., Johnson, G.V.W. (2004) *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*, TRENDS in Biochemical Sciences, Vol. 29, No.2, 95-102
- Kim, L., Kimmel, A. R. (2000) *GSK3, a master switch regulating cell-fate specification and tumorigenesis*, Current opinion in Genetics & Development 10:508-514
- Kortmansky, J., Shah, M.A., Kaubisch, A., Weyerbacher, A., Yi, S., Tong, W., Sowers, R., Gonen, M., O'Reilly, E., Kemeny, N., Ison, D.I., Saltz, L.B., Maki, R.G., Kelsen, D.P., Schwartz, G.K. (2005) *Phase I trial of the cyclin-*

- dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-Hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors*, J. Clin. Oncol. 23: 1875-1884
- Los, M., Voest, E.E., Borei Rinkes, I.H.M, (2005) *VEGF as a target of therapy in gastrointestinal oncology*, Dig Surg, 22; 282-293
- Manoukian, A.S., Woodget, J.R. (2002) *Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Cancer: Regulation by Wnts and other signaling pathways*, Adv. Cancer Res. 84:203-229
- Marko, D., Schätzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L., Eisenbrand, G. (2001) *Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by Indirubin derivatives in human tumour cells*, British journal of cancer, 84(2), 283-289
- Marvel, C.S., Hiers, G.S. (1941) *Isatin*, in: Gilman, H. (ed) (1941), Organic Synthesis, Coll Vol 1; 2nd edition, Wiley & sons, New York, 327-330
- Mathew Thomas, R., Iyengar, D.S (1999) *Synthesis of a novel sugar cyclotrimeratrylene by introduction of O-glycosyl-groups*, Synthetic Communications, 29(14), 2507-2513
- Meijer, L. et al. (2003) *GSK-3-selective Inhibitors derived from Tyrian Purple Indirubins*, Chemistry & Biology, Vol. 10, 1255-1266
- Morgan, D.O. (1997) *Cyclin-dependent Kinases: Engines, Clocks, and Micropocessors*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13:261-291
- Morin, P.J. (1999) *β -Catenin signaling and cancer*, BioEssays 21: 1021-1030
- Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.-H., Eisenbrand, G., Jove, R. (2005) *Indirubin derivatives inhibit STAT3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells*, PNAS, Vol. 102, No. 17, 5998-6003
- O'reilly E, Kemeny N, Ilson DI, Saltz LB, Maki RG, Kelsen DP, Schwartz GK (2005) *Phase I Trial of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor and Protein Kinase C Inhibitor 7-Hydroxystaurosporine in Combination With Fluorouracil in Patients With Advanced Solid Tumors*, Journal of Clinical Oncology 23: 1875-1884
- Pandraud, H. (1961) *Structure cristalline de l'indirubine*, Acta crystallogr. 14, 901-908
- Paulsen, H. (1982) *Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthesekomplexer Oligosacharide*, Angew. Chem. 94, 184-201
- Phiel, C.J., Wilson, C.A, Lee, V.M.Y., Klein, P.S. (2003) *GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides*, Nature 423, 435-439
- Polakis, P. (2000) *Wnt signaling in cancer*, Genes & Development 14:1837-1851

- Polychronopoulos, P. et al. (2004) *Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors for Glycogen Synthase Kinase-3 und Cyclin-dependent Kinases*, J. Med. Chem., 47, 935-946
- Russell, G.A., Kaupp, G. (1969) *Oxidation of carbanions IV. Oxydation of indoxyl to indigo in basic solution*, J. Am. Chem. Soc. 91, 3851-3859
- Sausville, E., Fiebig, H.H. (1997) *Flavopiridol: Selective antitumor activity in vitro and activity in vivo for prostate carcinoma cells*, Clin Cancer Res 3: 273-279
- Sausville, E.A., Johnson, J., Alley, M., Zaharevitz, D., Senderowicz, A.M. (2000) *Inhibition of CDKs as a therapeutic modality*, Ann N Y Acad Sci 910:207-221
- Schwahn, S. (2004) *Synthese von Indirubinen mit verbesserter Bioverfügbarkeit; Untersuchungen zur antineoplastischen Aktivität*, Dissertation
- Sedlacek, H.H., Czech, J., Maid, R., Knaur, G., Worland, P., Losiewicz, M., Parker, B., Carlson, B., Smith, A., Senderowicz, A., Suasville, E. (1996) *Flavopiridol, a new kinase inhibitor for tumor therapy*, International J. of oncology, 9:1143-1168
- Senderowicz, A.M. (2002) *The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01*, Oncologist 7 Suppl 3:12-9
- Sherr, C.J., Roberts, J.M. (1995) *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases*, Genes Dev. 9, 1149-1136
- Siemeister, G., Thierauch, K.-H., Prien, O., Jautelat, R., Eisenbrand, G. (2002), *Verwendung selektiver Indirubinderivate als VEGF-R Inhibitoren*, WO 02/092079, (Patent angemeldet durch Schering AG)
- Snieckus, V. (1990) *Directed ortho metalation. Tertiary amide and O-carbamate directors in synthetic strategies for polysubstituted aromatics*, Chem Rev 90, 879-933
- Stanetty, P., Koller, H., Mihovilovic, M., (1992) *Directed ortho-lithiation phenylcarbamic acid 1,1 dimethylethyl ester (N-Boc-aniline). Revision and improvements*, J. Org. Chem. 57, 6833-6837
- Ter Haar, E., Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.-M., Swenson, L., Jian, J. (2001) *Structure of GSK-3 β reveals a primed phosphorylation mechanism*, Nature structural biology, Vol. 8, No. 7, 593-596
- Thommet, A. (2001) *Indirubin-Derivate: Synthese und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen*, Dissertation

- Turkson, J., Jove, R. (2000) *STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery*, *Oncogenesis*, 19, 6613-6626
- Wedge et al. (2000) *ZD4190: An orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy*, *Cancer Res.* 60, 970-975
- Wingate H., Zhang, N., McGarhen, M.J., Bedrosian, I., Harper, J.W., Keyomarsi, K. (2005) *The tumor-specific hyperactive forms of Cyclin E are resistant to inhibition by p21 and p27*, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 15, 15148-15157
- Yamaguchi, M. (1990) *Novel Synthesis of Aryl 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranisides*, *J.Chem.Soc. Perkin TRANS.* 1
- Zhang, J.T., (2002) *New drugs derived from medicinal plants*, *Thérapie*, 75(2), 137-150

Dank

Mein Dank gilt allen Freunden und Bekannten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich

- Herrn Dr. Karl-Heinz Merz für die sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskriptes, die ständige Hilfsbereitschaft bei der Interpretation von NMR-Spektren und chemischen Fragen aller Art und schließlich für den überaus freundschaftlichen, offenen und angenehmen Umgang.
 - meinem Laborkollegen Dr. Frankie Hippe, der mich bzgl. des Uni-Lebens immer auf dem neuesten Stand der Dinge hielt, und mit dem ich einige lustige Momente im Labor erleben durfte.
 - meinem anfänglichen Laborkollegen Dr. Stefan Schwahn, der mich in die Kunst der Indirubin-Chemie einweihte, mich mit einer Fülle digitaler Informationen versorgte, und mit dem ich viele anregende Diskussionen jedweder Couleur, beleuchtet aus jedweder Perspektive führen konnte.
 - Herrn Dr. Michael Habermeyer, Frau Dr. Sandra Vatter, Frau Dr. Sandra Jakobs und Frau Dr. Melanie Kern für die bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der biologischen Untersuchungen, und für die biologischen Untersuchung einiger Substanzen.
 - Frau Hanna Ruzek und Frau Christiane Müller für die Messung der NMR-Spektren
 - Frau Heike Schramm für die „Projektkoordination“ und Terminplanung ab Juni 2007, die den Abschluss dieser Arbeit wesentlich erleichtert hat.
 - Herrn Rainer Scheuermann und Herrn Aribert Vetter für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung technischer Probleme
 - Bárbara für das „zu Hause“
 - meinem Bruder für die wichtigen Erfahrungen und Momente, die ich an seiner Seite erleben durfte
- ✕ meinen Eltern für die Tatsache, dass sie immer für mich da waren und sind, und es mir zu keiner Zeit an irgendetwas mangeln sollte.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stephan Mühlbeyer
Geburtsdatum: 25. Juni 1975
Geburtsort: St. Ingbert
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1981 – 1985	Langenäcker Grundschule, Homburg
1985 - 1994	Staatl. Mannlich Gymnasium, Homburg; Schulabschluss: Abitur

Hochschulstudium / berufliche Anstellung

1995	Beginn des Studiums der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern
2001	Diplom
2001	Beginn der Promotion an der Universität Kaiserslautern
2005	Abschluss der Labortätigkeit im Rahmen der Promotion
2006	Anstellung als Gruppenleiter der Qualitätskontrolle bei der Firma PHAST in Homburg
17.12.2007	Tag der wissenschaftlichen Aussprache als Abschluss der Promotion